

**FACTOR IX/FACTOR IXa ANTIBODIES AND ANTIBODY DERIVATIVES****Publication number:** JP2003509049 (T)**Publication date:** 2003-03-11**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

**- international:** C12N15/09; A61K39/395; A61P7/04; C07K16/18;  
C07K16/36; C07K16/40; C12N5/10; C12N5/12; C12N5/20;  
C12N15/02; C12N15/13; C12P21/02; C12P21/08;  
C12N15/09; A61K39/395; A61P7/00; C07K16/18;  
C07K16/40; C12N5/10; C12N5/12; C12N5/20; C12N15/02;  
C12N15/13; C12P21/02; C12P21/08; (IPC1-7): C12P21/08;  
C12N15/09; A61K39/395; A61P7/04; C07K16/36; C12N5/10;  
C12N15/02; C12P21/02

**- European:** C07K16/40

**Application number:** JP20010523763T 20000913**Priority number(s):** AT19990001576 19990914; WO2000EP08936 20000913**Also published as:**

 WO0119992 (A2)  
 WO0119992 (A3)  
 US7033590 (B1)  
 SK3662002 (A3)  
 RU2002109586 (A)

more &gt;&gt;

Abstract not available for JP 2003509049 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0119992 (A2)**

An antibody or antibody derivative against factor IX/activated factor IX (FIXa) which increases the procoagulant activity of FIXa.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

|                                  |       |                |             |
|----------------------------------|-------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>        | 識別記号  | F I            | テグメント* (参考) |
| C 1 2 N 15/09                    | Z N A | A 6 1 K 39/395 | D 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 39/395                   |       |                | N 4 B 0 6 4 |
|                                  |       | A 6 1 P 7/04   | 4 B 0 6 5   |
| A 6 1 P 7/04                     |       | C 0 7 K 16/36  | 4 C 0 8 5   |
| C 0 7 K 16/36                    |       | C 1 2 P 21/02  | C 4 H 0 4 5 |
| 審査請求 有 予備審査請求 有 (全 135 頁) 最終頁に続く |       |                |             |

|               |                             |          |  |
|---------------|-----------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2001-523763(P2001-523763) | (71) 出願人 | バクスター アクチエンゲゼルシャフト<br>オーストリア国 ウィーン アー1221,<br>インドустウリーシュトラッセ 67         |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年9月13日 (2000.9.13)      | (72) 発明者 | シャイフリンガー, フリードリッヒ<br>オーストリア国 アー1090 ウィーン,<br>ミヒェルポイエルンガッセ 4/17           |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成14年3月13日 (2002.3.13)      | (72) 発明者 | ケルシュバオマー, ランドルフ<br>オーストリア国 アー1190 ウィーン,<br>ペーター ヨルダン シュトラッセ 32<br>-34/17 |
| (86) 国際出願番号   | P C T / E P 0 0 / 0 8 9 3 6 | (74) 代理人 | 弁理士 山本 秀策  |
| (87) 国際公開番号   | W O 0 1 / 0 1 9 9 9 2       |          |  |
| (87) 国際公開日    | 平成13年3月22日 (2001.3.22)      |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | A 1 5 7 6 / 9 9             |          |  |
| (32) 優先日      | 平成11年9月14日 (1999.9.14)      |          |  |
| (33) 優先権主張国   | オーストリア (A T)                |          |  |
| 最終頁に続く        |                             |          |  |

(54) 【発明の名称】 第 I X 因子 / 第 I X a 因子の抗体および抗体誘導体

## (57) 【要約】

活性化された第 I X 因子 (F I X a) の凝血促進活性を増大する、第 I X 因子 / 活性化された第 I X 因子に対する抗体または抗体誘導体。本発明の第 I X 因子 / 第 I X a 因子-活性化抗体または抗体誘導体の作用は、インヒビター (例えば、第 V I I I 因子 / 第 V I I I a 因子に対するインヒビター) の存在によっては反対方向に影響されないが、代わりに、この場合は第 I X a 因子の凝血促進活性がまた増加される。本発明に従う調製物の投与は、F V I I I を抑制する患者の場合でさえも、第 V I I I 因子または第 V I I I a 因子の非存在においても迅速な血液凝固を可能とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第IX因子／第IXa因子に対する抗体または抗体誘導体であって、F IXaの凝血促進活性を増大させる、抗体または抗体誘導体。

【請求項2】 前記抗体または抗体誘導体が、F V I I Iインヒビターの存在下でF IXaの凝血促進活性を増大させる、請求項1に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項3】 前記抗体が、I g G抗体、I g M抗体、I g A抗体およびI g E抗体からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】 請求項1に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、該抗体または抗体誘導体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体、ダイアボディー、およびそれらのダイマー、オリゴマー、またはマルチマーからなる群から選択される、抗体または抗体誘導体。

【請求項5】 前記抗体誘導体が、相補的決定領域（CDR）ペプチドを含む、請求項1に記載の抗体誘導体。

【請求項6】 前記CDRペプチドがCDR3ペプチドである、請求項5に記載の抗体誘導体。

【請求項7】 請求項6に記載の抗体誘導体であって、ここで、前記CDR3ペプチドが、以下：

T y r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r ;

C y s - X - X - T y r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r - X - X - C y s ;

T y r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r ;

A s p - G l y - G l y - H i s - G l y - T y r - G l y - S e r - S e r - P h e - A s p - T y r ;および

P h e - A r g - A s n - A r g - G l y - M e t - T h r - A l a - L e u - L e u - L y s - V a l - S e r - S e r - C y s - A s p、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、  
Xは、任意の所望のアミノ酸であり得る、抗体誘導体。

【請求項8】 請求項1に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、  
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図14に記載のアミノ酸1～357および/またはアミノ酸403～726を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項9】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項8に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項10】 請求項1に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、  
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図15に記載のアミノ酸1～363および/またはアミノ酸409～747を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項11】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項10に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項12】 請求項1に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、  
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図16に記載のアミノ酸1～366および/またはアミノ酸412～747を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項13】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項12に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項14】 請求項1に記載の、第IX因子/第IXa因子に対する抗体または抗体誘導体を発現する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項15】 請求項14に記載のハイブリドーマ細胞株であって、ここで、  
該細胞株が、#196/AF1、#196/AF2、#193/AD3、#193/K2-1、#198/AC1/1、#198/AM1、#198/A1、#198/B1、#198/AP1、198/A1、198/B1、198/B1、198/A1、198/B1、198/B1からなる群から選択される、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項16】 請求項14に記載のハイブリドーマ細胞株によって発現される、請求項1に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項17】 DNA分子であって、該DNA分子が、請求項1に記載の抗体または抗体誘導体をコードする、DNA分子。

【請求項 18】 請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的調製物。

【請求項 19】 第 I X a  $\alpha$  因子および／または第 I X a  $\beta$  因子をさらに含む、請求項 18 に記載の調製物。

【請求項 20】 血液凝固障害に罹患した患者を処置するための方法であって、薬学的有効量の請求項 18 に記載の調製物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の方法であって、ここで、前記血液凝固障害が、血友病 A および出血性素質を含む群から選択される、方法。

【請求項 22】 血友病を抑制する患者を選択する工程をさらに包含する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 第 I X 因子／第 I X a 因子と相互作用し、そして第 I X a 因子の凝血促進活性を増大させる抗体または抗体誘導体を得る方法であって、以下の工程：

- － F I X、F I X a  $\alpha$ 、F I X a  $\beta$  またはそれらのフラグメントからなる群から選択される抗原で、免疫応答性マウスを免疫する工程、
- － 免疫されたマウスの脾細胞を単離する工程、
- － ハイブリドーマクローンを産生する工程、
- － 第 I X a 因子の凝血促進活性における増大について、ハイブリドーマ細胞の上清をスクリーニングし、第 I X a 因子の凝血促進活性における増大を示すハイブリドーマ細胞の上清から、該抗体または抗体誘導体を単離および精製する工程、

を包含する、方法。

【請求項 24】 第 I X a 因子のアミド分解活性を増大させるための、請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、第ⅠⅩ因子／第ⅠⅩa因子-抗体および抗体誘導体に関する。

【0002】

血餅（血栓）は、凝固カスケードと呼ばれる一連のチモーゲン活性化によって形成される。この酵素的カスケードの過程において、このようなチモーゲン（因子といわれる）の各々の活性化形態は、次のチモーゲンの活性化を触媒する。血栓は、血管壁の表面上の血液成分の蓄積物であり、そして主に、凝集した血小板および不溶性の架橋したフィブリンからなる。フィブリンの形成は、フィブリノーゲンの制限されたタンパク分解によって、トロンビンによってもたらされる。トロンピンは、凝固カスケードの最終生成物である（K. G. Mann, Blood, 1990, Vol. 76, pp. 1-16）。

【0003】

活性化された第ⅠⅩ因子（FⅠⅩa）および活性化された第ⅤⅡⅡ因子（FⅤⅡⅡa）の複合体による第Ⅹ因子の活性化は、凝固における重要な工程である。この複合体の成分の非存在またはその機能の妨害は、血友病と呼ばれる血液凝固障害に関連する（J. E. Sadler & E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, G. Stamatoyannopoulosら（編）: The molecular basis of blood diseases, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602）。血友病Aは、第ⅤⅡⅡ因子活性の（機能的）欠如を示すが、血友病Bは、第ⅠⅩ因子活性の欠如によって特徴付けられる。現在は、血友病Aの処置は、第ⅤⅡⅡ因子濃縮物の投与による補充療法を介してもたらされる。しかし、約20～30%の血友病Aの患者は、第ⅤⅡⅡ因子インヒビター（すなわち、第ⅤⅡⅡ因子に対する抗体）を発生させ、それによって投与された第ⅤⅡⅡ因子調製物の効果が阻害される。第ⅤⅡⅡ因子を抑制する患者の処置は、非常に困難かつ危険性を含み、そして従来はこれらの患者を処置するために限定された数の処置しか存在しなかった。

#### 【0004】

低いFVⅢⅠⅠインヒビターレベルを有する患者の場合において、高用量の第VⅢⅠⅠ因子をこのような患者に投与して、従って第VⅢⅠⅠ因子に対する抗体を中和することは、高価であるが可能である。次いで、インヒビター抗体を中和するために必要な量を超える量の第VⅢⅠⅠ因子は、うっ血作用を有する。多くの場合において、脱感作がもたらされ得、次いでその上に、標準的な第VⅢⅠⅠ因子処置を再び適用し得る。しかし、大量の第VⅢⅠⅠ因子を必要とするこのような高用量第VⅢⅠⅠ因子処置は多大な時間を必要とし、そして重篤なアナフィラキシーの副反応を伴い得る。あるいは、この処置は、ブタの第VⅢⅠⅠ因子分子を用いて行われ得る。

#### 【0005】

さらなる高コストの方法は、免疫グロブリン（プロテインA、プロテインG）または固定化された第VⅢⅠⅠ因子に結合するレクチン上の、特別な体の免疫吸着（extra corporeal immunoadsorption）を介して第VⅢⅠⅠ因子インヒビターを除去する工程を包含する。この処置の間、患者はアフエーシス器械に連結されなければならないので、この処置はまた、患者への大きな負担となる。この方法においてはまた、急性の出血を処置することはできない。

#### 【0006】

現在、最上の治療は、活性化されたプロトロンビン複合体濃縮物（APCC）（例えば、FEIBA（登録商標）およびAUTOPLEX（登録商標））を投与することであり、これは、高いインヒビター力価を有する患者においてさえも、急性出血の処置に適切である（DE 31 27 318）。

#### 【0007】

血液凝固の脈管内系において、最後の段階は第X因子の活性化である。この反応は、第VⅢⅠⅠa因子の第ⅠXa因子への結合、ならびに第ⅠXa因子、第VⅢⅠⅠa因子、第X因子およびリン脂質からなる「テナーゼ（tenase）」複合体の形成によって刺激される。FVⅢⅠⅠaの結合なしでは、FIXaは酵素活性を示さないか、またはFXと比較してほんのわずかの酵素活性しか示さない

い。

【0008】

最近の数年にわたって、第IX因子に対する第VIIa因子の可能な多くの結合部位が特徴付けられ、これらの領域に結合する抗体またはペプチドが、FIXaの活性を阻害することが示されている（Fayら、J. Biol. Chem., 1994, Vol. 269, pp. 20522-20527, Lentingら、J. Biol. Chem., 1996, Vol. 271, pp. 1935-1940, Jorqueraら、Circulation, 1992, Vol. 86, 抄録2725）。第IX因子のような凝固因子の阻害はまた、血栓症の形成の予防の目的で、モノクローナル抗体の使用を介して達成される（WO 97/26010）。

【0009】

逆の効果（すなわち、第X因子の第IX因子媒介活性化における増大）は、第IX因子への第VII因子ペプチド（アミノ酸698〜712）の結合を介して、Liles D. K. ら、（Blood, 1997, Vol. 90, 補遺1, 2054）によって記載された。けれども、この効果は、第VIIa因子の非存在においてのみ生じ、一方、第VIIaの存在下では、第X因子の第IX因子／第VIIa因子媒介切断は、このペプチドによって阻害される。

【0010】

（発明の要旨）

血友病患者の処置において生じ得る可能な危険性および副作用の観点から、FVIIを抑制する患者の有効な処置を可能にする治療の必要性が存在する。そのため、第VII因子を抑制する患者についての特定の利点を有する、血液凝固障害の処置のための調製物を提供することが本発明の目的である。

【0011】

本発明に従って、この目的は、第VIIa因子補因子活性または第IX因子活性化活性を有し、そして第IX因子の凝血促進活性における増加を導く、第IX因子／第IX因子に対する抗体または抗体誘導体の使用を通して達成される。驚いたことに、本発明の第IX因子／第IX因子一活性化抗体または抗



体誘導体の作用は、インヒビター（例えば、第ⅤⅠⅠⅠ因子／第ⅤⅠⅠⅠa因子に対するインヒビター）の存在によっては反対方向に影響されないが、代わりに、この場合は第ⅠⅩa因子の凝血促進活性がまた増加される。

【0012】

本発明のさらなる利点は、本発明に従う調製物の投与が、FⅤⅠⅠを抑制する患者の場合でさえも、第ⅤⅠⅠⅠ因子または第ⅤⅠⅠⅠa因子の非存在においても迅速な血液凝固を可能とすることである。驚いたことに、これらの因子はまた、第ⅤⅠⅠⅠa因子の存在下においても有効である。

【0013】

従って、本発明に従う抗体および抗体誘導体は、FⅤⅠⅠ補因子様の活性を有し、これは、2時間のインキュベーション後のFⅤⅠⅠアッセイ（例えば、COATEST（登録商標）アッセイまたはイムノクロム（Immunochrom）試験）において、少なくとも3のバックグラウンド（基本的ノイズ）対測定値の比を示す。この比の計算は、例えば、2時間のインキュベーションの後に、以下のスキームに従って達成され得る：

【0014】

【数1】

抗体測定（OD 405）－因子からのブランク値 > 3

マウス-IgG-測定（OD 405）－因子からのブランク値

本発明に従う抗体は、好ましくは少なくとも5日、より好ましくは少なくとも10日のインビボ半減期を有するが、少なくとも20日の半減期を有するのがより好ましい。

【0015】

本発明のさらなる局面は、第ⅠⅩ因子／第ⅠⅩa因子に対する抗体および／または抗体誘導体、ならびに薬学的に受容可能なキャリア物質を含む調製物である。さらに、本発明に従う調製物は、第ⅠⅩ因子および／または第ⅠⅩa因子をさ

らに含み得る。

【0016】

本発明のさらなる局面は、第IXa因子のアミド分解 (amidolytic) 活性を増加するための、この抗体または抗体誘導体の使用である。

【0017】

(抗体および抗体誘導物)

本発明はまた、本発明の抗体および抗体誘導物、発現ベクター、ハイブリドーマ細胞株をコードする核酸、ならびにこれらを産生するための方法を包含する。

【0018】

抗体は、免疫グロブリン分子の合成(または、それぞれ、その免疫原)を誘発する抗原にのみ結合する、あるいはその抗原に大変類似する抗原(または免疫原)にのみ結合する、特異的なアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子である。各免疫グロブリン分子は、2つの型のポリペプチド鎖からなる。各分子は、大きな、同一の重鎖(H鎖)、および2つの軽い、同一でもある鎖(L鎖)からなる。ポリペプチドは、ジスルフィド架橋および非共有結合によって結合する。インビボでは、重鎖および軽鎖は、異なるリボソーム上で形成され、細胞内で組み立てられ、そしてインタクトな免疫グロブリンとして分泌される (Immunology, 第2版, 1989内のRoitt I. ら)。

【0019】

本発明の抗体、および抗体誘導物、ならびにこれらから誘導された有機化合物は、ヒトおよび動物のモノクローナル抗体またはそれらのフラグメント、一本鎖抗体およびそれらのフラグメントならびにミニ抗体、二重特異的 (bispecific) 抗体、二重抗体 (diabody)、三重抗体 (triabody)、またはそれらのダイマー、オリゴマーもしくはマルチマー (multimer) を含む。本発明に従う抗体から誘導されたペプチドミメティックス (peptidomimetics) またはペプチド (例えば、これらは、1つまたはいくつかのCDR領域、好ましくはCDR3領域を含む) もまた含まれる。

【0020】

さらに、構造の活性関連に基づいて、人工的モデリングプロセスによって産生

されるヒトモノクローナル抗体およびペプチド配列も含まれる (Greer J.ら、J. Med. Chem.、1994、Vol. 37、pp. 1035-1054)。

#### 【0021】

用語第IX/Xa因子活性化抗体および抗体誘導物はまた、宿主細胞内における、変更された、免疫グロブリンコード領域の発現によって産生されるタンパク質 (例えば、合成抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体のような「技術的改変抗体」、またはそれらの混合物、あるいは例えば、Fv、Fab、Fab' またはF(ab)'<sub>2</sub>などの定常領域を部分的もしくは完全に欠損する抗体フラグメント) を含む得る。これらの技術的改変抗体において、例えば、軽鎖および/または重鎖の一部分またはいくらかの部分は、置換され得る。このような分子は、例えば、ヒト化重鎖および未改変軽鎖 (またはキメラ軽鎖) からなる抗体を含む得、逆も同様である。用語Fv、Fc、Fd、Fab、Fab' またはF(ab)'<sub>2</sub>は、先行技術 (Harlow E. および Lane D.、「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory、1988) に記載されるように用いられる。

#### 【0022】

本発明はまた、モノクローナル抗体 (mAb) から誘導されるFabフラグメントまたはF(ab)<sub>2</sub>フラグメントの使用を含み、これらのフラグメントは、第IX因子/第IXa因子に対して指向され、そして第IXa因子のプロコアギユラント (procoagulant) 活性の増加を引き起こす。好ましくは、異種のフレームワーク領域および定常領域は、ヒト免疫グロブリンクラスおよびアイソタイプ (例えば、IgG (サブタイプ1~4)、IgM、IgAおよびIgE) から選択される。免疫応答の過程において、免疫グロブリンのクラス変更 (例えば、IgMからIgGへの変更; ここでは、定常領域が (例えば、μからγへ) 変換される) が起こり得る。先行技術 (Esser C. および Radbruch A.、Annu. Rev. Immunol.、1990、Vol. 8、pp. 717-735) から公知のように、クラス変更はまた、指向された様

式で、遺伝子操作方法（「指向されたクラス変更組換え」）によって引き起こされ得る。しかし、本発明に従う抗体および抗体誘導物は、免疫グロブリンタンパク質のヒト配列を特別に含む必要はない。

#### 【0023】

ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体からの補体決定領域（CDR）を含み、この領域は、選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域に挿入される。しかし、ヒトCDR領域もまた使用され得る。好ましくは、ヒト軽鎖および重鎖における可変領域は、1以上のCDR変換によって技術的に変えられる。6つの全てのCDR、または6未満のCDRの種々の組み合わせを使用することもまた可能である。

#### 【0024】

本発明に従うヒト化抗体は、好ましくは、ヒト抗体の構造、またはそのフラグメントの構造を有し、そして治療的適用（例えば、患者（好ましくは、第VII因子を抑制する患者）における凝固障害の処置）のために必要な特徴の組み合わせを含む。

#### 【0025】

キメラ抗体は、ヒト免疫グロブリンからの重鎖および軽鎖の両方の鎖の定常領域と組み合わせて、非ヒト起原の重鎖および軽鎖のフレームワーク領域を含む、可変領域全体を含むという点で、ヒト化抗体と異なる。例えば、マウス配列およびヒト配列からなるキメラ抗体が産生され得る。本発明に従うと、抗体および抗体誘導物はまた、一本鎖抗体、またはミニ抗体（例えば、ブリンリッチ配列およびオリゴマー化（oligomerisation）ドメインに結合するscFvフラグメント（例えば、Pluckthun A. およびPack P.、Immunotechnology、1997、Vol. 3、pp. 83-105）、もしくは一本鎖Fv（sfv）（これは、一本のポリペプチド鎖内の抗体結合領域全体を組み込む）であり得る。例えば、一本鎖抗体は、オリゴヌクレオチドにV遺伝子を結合することによって形成され得、このオリゴヌクレオチドは、リンカー配列として構築されており、そして第1のV領域のC末端を第2のV領域のN末端と、例えば、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-V<sub>H</sub>の

配置で結合し；従って、両方とも ( $V_H$ および $V_L$ ) は、N末端ドメインを表し得る (Huston JSら, *Int. Rev. Immunol.*, 1993, Vol. 10, pp. 195-217; Raag R. およびWhitlow M., *FASEB J.*, 1995, Vol. 9, pp. 73-80)。リンカー配列として使用され得るタンパク質は、例えば、150 Åまで、好ましくは80 Åまで、そしてより好ましくは40 Åまでの長さを有する。グリシンおよびセリンを含むリンカー配列は、これらの可塑性のために特に好ましく、または、グルタミンおよびリジンを含むリンカー配列は、それぞれ、これらの可溶性のために好ましい。アミノ酸の選択は、免疫原性および安定性の基準に従ってなされ、これらの一本鎖抗体が、生理学的適用または工業的適用 (例えば、免疫アフィニティクロマトグラフィー) に適し得るか否かにも依存する。この一本鎖抗体はまた、凝集体として (例えば、トリマー、オリゴマー、またはマルチマーとして) 存在し得る。しかし、リンカー配列はまた失われ、そして $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖の結合が直接起こり得る。

#### 【0026】

二重特異性抗体は、1つの単一分子内に2つの異なった結合特異性を有する、高分子のヘテロ二機能性架橋である。この群には、例えば、二重特異性 (bs) IgG、bs IgM-IgA、bs IgA-二量体、bs (Fab')<sub>2</sub>、bs (scFv)<sub>2</sub>、ダイアボディー (diabodies)、およびbs bis Fab Fcが属する (Cao Y. およびSuresh M. R., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 第9巻、635-644頁)。

#### 【0027】

ペプチド模倣物によって、天然ペプチド成分の構造を模倣するかまたはその銚型が隣接したペプチド配列における特異的構造形成を誘導する低分子のタンパク質成分が理解される (Kemp DS, *Trends Biotechnol.*, 1990, 249-255頁)。ペプチド模倣物は、例えば、CDR3ドメインに由来し得る。所定のペプチド配列の系統的な変異分析、すなわち、アラニンまたはグルタミン酸走査変異分析によって、凝血促進活性に重要なペプチド残

基の同定を可能にする。特定のペプチド配列の活性を改善するための別の可能性は、高い処理能力のスクリーニングと組み合わせたペプチドライブラリーの使用である。

#### 【0028】

用語抗体および抗体誘導体はまた、構造-活性関係に関連するデータの分析によって獲得される因子を含み得る。これらの化合物はまた、ペプチド模倣物として使用され得る (Grassy G. ら, *Nature Biotechnology*, 1998, 第16巻, 748-752頁; Greer J. ら, *J. Med. Chem.*, 1994, 第37巻, 1035-1054頁)。

#### 【0029】

本発明に従って、抗体または抗体誘導体を発現するハイブリドーマ細胞の例としては、ブタベスト条約に従って、番号99090924 (#198/A1)、99090925 (#198/B1) および99090926 (#198/BB1) 下で1999年9月9日に、そして、番号99121614 (#193/A0)、99121615 (#196/C4)、99121616 (#198/D1)、99121617 (198/T2)、99121618 (#198/G2)、99121619 (#198/AC1) および99121620 (#198/U2) 下で1999年12月16日に寄託された。

#### 【0030】

##### (産生の方法)

本発明の抗体は、先行技術から公知の方法によって調製され得る (例えば、慣例的なハイブリドーマ技術によってかまたはファージディスプレイ遺伝子ライブラリー、免疫グロブリン鎖混合の方法もしくはヒト化技術によって) (Harlow E. および Lane D., *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。本発明の抗体および抗体誘導体の産生は、例えば、慣例的なハイブリドーマ技術によって行なわれる (*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Harlow および Lane 編, 148-24

2頁)。本発明に従って、ヒトおよび非ヒト種（例えば、ウシ、ブタ、サル、ニワトリおよびげっ歯類（マウス、ラット））はまた、ハイブリドーマ技術のために使用され得る。通常、免疫競合Balb/cマウスまたはF1X欠損マウスは、使用され得る（第1X因子欠損マウスは、ノースキャロライナ大学、Chapel HillのDarrel Stafford博士より分譲され得る）。免疫化は、例えば、第1X因子、第1Xa因子または完全に活性化された第1Xaβ因子、またはそのフラグメントで影響され得る。

#### 【0031】

ハイブリドーマ細胞の上清における抗体および抗体誘導体が第1X因子/第1Xa因子に結合し、そして、第1Xa因子の凝血促進性活性の増加の原因となるという事実を望んで、ハイブリドーマは選択される。凝血促進性活性の増加は、例えば、第VII因子様活性の測定のための先行技術から公知のアッセイ方法（例えば、色素形成（chromogenic）アッセイ）によって証明され得る。

#### 【0032】

あるいは、本発明の抗体および抗体誘導体はまた、組換え産生方法によって産生され得る。そうする際、本発明に従う抗体のDNA配列は、公知の技術によって決定され得、そして、抗体DNA全体またはその一部は、適切な系で発現され得る。ファージディスプレイ、合成および天然ライブラリー、公知の発現系における抗体タンパク質の発現、またはトランスジェニック動物における発現を含むような組換え産生方法は、使用され得る（Jonesら、Nature, 1986、第321巻、522-525頁；Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual, 1996, Kayら編、127-139頁；米国特許第4,873,316号；Vaughan T. J. ら、Nature Biotechnology, 1998, 535-539頁；Persic Lら、Gene, 1997, 9-18頁；Ames R. S. ら、J. Immunol. Methods, 1995, 177-186頁）。

#### 【0033】

組換え的に産生された抗体の発現は、慣例的な発現ベクターの方法（例えば、細菌ベクター（例えば、pBr322およびその誘導体）、pSKFまたは真核生物ベクター（例えば、pMSGおよびSV40ベクター））によって影響される。抗体をコードするこれらの配列は、複製、発現および宿主細胞からの分泌を調節する制御配列を提供され得る。これらの制御配列は、プロモーター（例えば、CMVまたはSV40）およびシグナル配列を含む。

#### 【0034】

発現ベクターはまた、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（DHFR）、ハイグロマイシン-B-ホストトランスフェラーゼ、チミジinkinナーゼなどの選択および増幅マーカースを含み得る。

#### 【0035】

使用されるベクターの成分（例えば、選択マーカース、レプリコン、エンハンサーなど）は、慣例的な方法の手段によって商業的に獲得され得るかまたは調製され得る。このベクターは、例えば、哺乳動物細胞（CHO、COS、線維芽細胞など）、昆虫細胞、酵母または細菌（E. coli など）についての種々の細胞培養物における発現のために構築され得る。好ましくは、発現タンパク質の最適なグリコシル化を可能にするこれらの細胞が使用される。特に好ましいのは、CHO細胞またはSK-HePにおいて発現されるベクターpBax（参考、図17）である。

FabフラグメントまたはF(ab)<sub>2</sub>フラグメントの産生は、先行技術から公知の方法に従って影響され得る（例えば、パパインおよび/またはペプシンなどのタンパク分解性酵素を使用して、mAbを切断することによってまたは組換え法によって）。これらのFabおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントはまた、ファージディスプレイ遺伝子ライブラリーの方法によって調製され得る（Winterら、1994, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455）。

#### 【0036】

抗体誘導体はまた、先行技術から公知の方法の手段によって調製され得る（例えば、Grassy G. ら、Nature Biotechnol., 199



8, 第16巻、748-752、またはGreer J. ら、J. Med. Chem., 第37巻、1035-1054頁、またはRees A. ら、「Protein Structure Prediction; A practical approach」Sternberg M. J. E. 編、IRL出版、1996、第7-10章、141-261頁からの分子モデリングによって）。

【0037】

本発明の抗体および抗体誘導体の精製はまた、先行技術で記載された方法によって行なわれ得る（例えば、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティー精製（プロテインGセファロース）、イオン交換クロマトグラフィー、またはゲルクロマトグラフィーによって）。本発明の抗体および抗体誘導体が、第IX因子／第IXa因子に結合し、第IXa因子の凝血促進性活性を増加するかまたは第VIII因子様活性を有することを示すための試験方法として、以下の方法は使用され得る：一工程凝血試験（MikaelssonおよびOswaldson, Scand. J. Haematol., Suppl., 33, 79-86頁、1984）または色素形成試験（COATEST VIII:C（登録商標）（Chromogenicix）またはImmunoChrom（IMMUNO）など）。原則的には、第VIII因子活性を決定するために使用される全ての方法が使用され得る。測定のコントロールブランク値として、例えば、非特定のマウスIgG抗体が使用され得る。

【0038】

本発明の抗体および抗体誘導体は、例えば、血友病Aの場合において、第VIII因子を抑制する患者などのための凝血障害の処置における治療的使用に適している。投与は、患者に治療学的因子を効果的に投与するのに適切な任意の方法によって、影響され得る（例えば、経口投与、皮下投与、筋内投与、静脈内投与または鼻腔内投与によって）。

【0039】

本発明に従う治療学的因子は、薬学的に受容可能なキャリア物質中に活性な因子として十分な量の抗体または抗体誘導体を含む調製物として産生され得る。これらの因子は、液体または粉末形態のいずれかで存在し得る。さらに、本発明に

従う調製物はまた、異なった抗体、その誘導体および／またはそれらから誘導された有機化合物の混合物、ならびに、抗体および第ⅠⅩ因子および／または第ⅠⅩα因子からなる混合物を含み得る。第ⅠⅩα因子は、第ⅠⅩα因子および／または第ⅠⅩβ因子として存在し得る。水性キャリア物質の例は、例えば、生理食塩水である。溶液は滅菌性で、滅菌は慣例的な方法によって影響される。

【0040】

本発明に従う抗体または抗体誘導体は、貯蔵のために凍結乾燥形態で存在し得、そして、投与の前に適切な溶媒で懸濁され得る。この方法は、一般的に慣例的な免疫グロブリンについて有利であることが証明され、そして、公知の凍結乾燥および再構成方法は、この場合で適用され得る。

【0041】

さらに、本発明に従う抗体および抗体誘導体はまた、工業的適用に使用され得る（例えば、アフィニティークロマトグラフィーの方法による第ⅠⅩ因子／第ⅠⅩα因子の精製のためか、または検出方法（例えば、ELISAアッセイ）の成分としてか、または標的タンパク質の機能的ドメインの同定および相互作用のための因子として）。

【0042】

本発明は、以下の実施例および図面によって、より詳細に記載されるが、本発明はそれに対して制限されるべきではない。

【0043】

(実施例)

(実施例1：免疫融合マウスの免疫化および抗FⅠⅩ／ⅠⅩα抗体分泌ハイブリドーマ細胞の産生)

1～3匹の正常免疫融合5～8週齢Balb/cマウスを個体内(i.p.)経路を介して100μgの抗原(100μl用量)で免疫化した。代表的な実験では、マウスを組換えヒト凝血因子(F)ⅠⅩ(Benefix<sup>TM</sup>)、ヒト活性化FⅠⅩα(Enzyme Research Laboratories, Lot:FⅠⅩα 1190L)または水酸化アルミニウムもしくはKFAで補助したヒトFⅠⅩβ(Enzyme Research Laborato

ries, Lot: HFIXaa 1332 AL) のいずれかで接種した。

【0044】

個々のマウスを $100\mu\text{g}$ の抗原( $100\mu\text{l}$ 用量, i. p.)で種々の時間にブーストし、そして、2日後に屠殺した。脾臓細胞を取り出し、そして、Laneら、1985(J. Immunol. Methods, 第81巻、223-228頁)に基本的に記載されるように、P3 X63-Ag86. 5. 3骨髄腫細胞に融合させた。それぞれの融合実験を個々に番号付けた(すなわち、#193、195、196または198)。

【0045】

ハイブリドーマ細胞をマクロファージフィーダー層上の96ウェルプレート上で増殖し(約 $10^5$ 細胞/ $\text{ml}$ )そしてHAT培地(抗生物質、10%FCS、ビルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、2-メルカプトエタノールおよびHAT(HAT  $100\times\text{H}_2\text{O}$ 中の $1.0\times 10^{-2}\text{M}$ ヒポキサンチン(136.1mg/ $100\text{ml H}_2\text{O}$ )、 $\text{H}_2\text{O}$ 中の $4.0\times 10^{-5}\text{M}$ アミノプテリン( $1.76\text{mg}/100\text{ml H}_2\text{O}$ )および $\text{H}_2\text{O}$ 中の $1.6\times 10^{-3}\text{M}$ チミジン( $38.7\text{mg}/100\text{ml H}_2\text{O}$ ))で補充したRPMI-1640培地)中で選択した。培地を6日後に最初に交換し、その後1週間に2回交換した。2~3週間後、HAT培地をHT培地(抗生物質、10%FCS、ビルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、2-メルカプトエタノールおよびHTで補充したRPMI-1640)に変更し、その後(さらに1~2週間後)通常の増殖培地(10%FCS、ビルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよび2-メルカプトエタノールで補充したRPMI-1640培地)(HYBRIDOMA TECHNIQUES, EMBO, SKMB Course 1980, Baselを参照のこと)に変更した。

【0046】

別のセットの実験において、F IX欠損C57B16マウス(Linら、1997, Blood, 90:3962)を免疫化および後に続くハイブリドーマ産生のために使用した。F IXノックアウト(k. o.)マウスは、内因性F IXを発現しないので、達成可能な抗(a)-F IX抗体スペクトルは、正常なBa

l b/cマウスと比較して異なっていることが推定される（耐性の欠如に起因して）。

#### 【0047】

（実施例2：抗FIX/FIXa抗体分泌ハイブリドーマ上清におけるFVIIII様活性のためのアッセイ）

ハイブリドーマ細胞によって分泌される抗FIXa抗体のFVIIII様活性をアッセイするために、市販されている試験キットCOATEST VIIII:C/4（登録商標）（Chromogenix）を使用した。アッセイは、以下の改変を使用して基本的に製造業者によって記載されるように行なった：

高い処理能力のスクリーニングを可能にするために、アッセイをマイクロタイタープレート型式に小規模化した。簡潔には、ハイブリドーマ上清の25μlのアリコート、マイクロタイタープレート（Costar, #3598）ウェルに移し、そして、37℃に温めた。色素形成基質（S-2222）、合成トロンビンインヒビター（I-2581）、因子（F）IXaおよびFXを滅菌水中で再構築し、そして、FIXa/FXを、製造業者のプロトコルに従って、リン脂質で混合した。反応液当たり、50μlのリン脂質/FIXa/FX溶液を25μlの塩化カルシウム（25mM）および50μlの基質/インヒビター反応混液と組み合わせた。反応を開始するために、125μlのプレミックスをマイクロタイタープレート中のハイブリドーマ上清に添加し、そして、37℃でインキュベートした。サンプルの405nmおよび490nmの吸光度を、Labsystems iEMS Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーで、試薬ブランクに対して（MLW、ハイブリドーマ上清の代わりの細胞培養培地）種々の時間（30分～12時間）測定した。サンプルのFVIIII様活性を、GENESIS™ソフトウェアを用いて、希釈したFVIIII参照標準（IMMUNO AG #5T4AR00）の吸光度に対してサンプルの吸光度を比較することによって計算した。

ハイブリドーマ細胞培養物上清におけるFVIIII様活性のスクリーニングの結果を図1に示す。融合実験#193、#195および#196由来の選択される前のクローン（上記を参照のこと）を記載されるように、色素形成FVIIIIア

ッセイで調査した。クローン193/M1、193/N1および193/P1は、マスタークローン193/C0由来のサブクローンであった（以下を参照のこと）。マスタークローン195/10は融合実験#195に由来し、そして、クローン196/A0、196/B0および196/C0は、融合実験#196由来であった。代表的なスクリーニング実験において、単一の融合実験由来の約1000クローン（96ウェル中）は、F V I I I様活性についてスクリーニング前と同じであった。続いて、選択されたクローンを大規模に増殖し（3～5 mlの上清）そして、色素形成アッセイで再分析した。陰性コントロールとして、細胞培養培地をそれぞれのプレート（MLW）上でアッセイした。

#### 【0048】

高いF V I I I様活性または有意なF V I I I様活性のどちらかを示すウェルをサブクロニング手順に供した。選択およびサブクロニングプロセスは、細胞株（すなわち、193/C0）を産生するI g Gのスクリーニングおよびサブクロニングについて例示されるが、クローンを産生するI g M（すなわち、196/C0、以下を参照のこと、図5）について同一の方法を正確に行なった。

#### 【0049】

選択プロセスを、10の96ウェルプレート上の単一融合実験由来の全てのハイブリドーマ細胞クローンを最初に播種することによって行ない、これによって、いわゆる「マスタープレート」を作製した。マスタープレート上の別々の位置（ウェル）は、通常、1つ以上のハイブリドーマ細胞クローン（通常3～15の異なったクローン）を含んだ。続いて、数千の細胞のみによって分泌された抗体を試験した。これらの細胞を、抗体産生に最適以下の条件下で増殖し、この条件は、細胞死の細胞において最も公知である。それで、上清における予想された特異的な抗F I X抗体濃度は、 $10^{-12}$ ～ $10^{-14}$ Mの範囲であり得る。このことは、なぜインキュベーション期間が、標準的F V I I Iアッセイと比較して延長されなければならないかを説明する。

#### 【0050】

マスタープレートのハイブリドーマ細胞培養物上清におけるI g G媒介性F V I I I様活性についてのスクリーニングの結果を、図2に示す。上清を、色素形

成F V I I I アッセイにおいて試験した。融合実験番号#193 (F I X a αで免疫したB a l b / cマウス) の5番目のマスタープレートから誘導される結果を示す。吸光度を、37℃でのインキュベーションの4時間後に読み取った。E S位を、ブランク (M L W) より有意に高いF V I I I 様活性を示すと同定した。この細胞プールを、193/C0と名付け、そしてさらにサブクロニングした(図3)。マスタープレートの各ウェルは、1つより多いハイブリドーマ細胞クローンを含むので、単一の陽性ウェルの細胞を、2~0.2細胞/ウェルの計算された細胞密度で、96ウェルプレートにおいて、伸長およびプレートした。再度、その上清を、F V I I I 様活性について試験し、そして陽性位置を、サブクロニングのさらなるラウンドに供した。代表的に、均一な細胞集団を得るために、F V I I I 様活性を示す各クローンを使用して、3~4ラウンドのサブクロニングを実施した。ここで、193/C0サブクロンの色素形成アッセイの結果を示す。吸光度を、37℃での4時間のインキュベーション期間の後に、読み取った。A6位およびD5位は、かなりのF V I I I 様活性を示し、そしてそれぞれ、193/M1および193/P1と命名した。これら2つのクローンと、さらなるラウンドのサブクロニングに供した。ネガティブコントロールとして、単細胞培養培地を、各プレートにおいてアッセイした (M L W (H1)) 。

#### 【0051】

小スケール (3ml) ハイブリドーマ培養物における色素形成F V I I I 様活性とF I X - E L I S A 反応性との比較を、図4に示す。マスタークローン (またはサブクローン) がさらにサブクロニングされるべきか否かを決定する前に、クローンを3~5mlのスケールで増殖し、そしてその上清を、再度チェックした。このグラフは、マスタークローン193/C0、および陽性と同定され、そして再チェックされた全てのそのサブクロンの、F I X 特異的E L I S A の結果およびF V I I I 様色素形成活性を示す。本明細書中に記載されるE L I S A および色素形成アッセイの読み取りの場合には、ブランク (色素形成試薬自体の吸光度) を減算した。クローン193/M1をサブクロニングし、そしてクローン193/V2、193/M2および193/U2を得た。193/P1、

193/AB2および193/P2由来の第2ラウンドの他のクローンを、サブクローニングした。193/AF3、193/AB3および193/AE3は、193/AB2のサブクローンである。第3ラウンドの他のクローンは、193/P2から生じた。最後に、193/AF3 (→193/AF4)、AE3 (→193/AE4、193/AL4、193/AN4および193/AO4) ならびに193/AD3 (→193/AG4、193/AH4、193/AD4、193/AI4、193/AK4) を、サブクローニングした。

#### 【0052】

各融合実験から、いくつかの(5~15)マスタークローン(マスタープレートから選択される)を同定し、そしてサブクローニングに供した。3ラウンドのサブクローニングの後に、大部分の細胞株は、ELISAおよび色素形成活性分析(図4を参照のこと)ならびにcDNA配列分析により示されるように、均一であった。特定のマスタークローンおよびその全てのサブクローンは、同じFIX/FIXa結合抗体を産生する。しかし、異なるマスタークローン由来のクローンの抗体タンパク質配列には、大きな差異が存在する(実施例11を参照のこと)。大部分のハイブリドーマ細胞株は、IgGサブクラスから抗体を発現する(すなわち、クローン#193、#198から、198/A1、198/B1、198/B1のような)。しかし、本発明者らはまた、IgM抗体を発現するいくつかのクローンを、選択し得た。

#### 【0053】

いくつかの重要なマスタークローンおよびサブクローンのハイブリドーマ上清の色素形成活性を、決定した。吸光度を、37℃での1時間30分および3時間30分のインキュベーション期間の後に、測定した(図5)。193番目の融合物由来の全てのクローンは対照的に、クローン196/C0およびそのサブクローン196/AP2は、FIX/FIXa特異的IgM抗体を産生した。この抗体は、短時間のインキュベーションの後でさえも、強力な色素形成活性を示した。

#### 【0054】

以下の細胞株を、ブダペスト条約に従って、European Collec

tion of Cell Cultures (ECACC) に寄託した：98/B1 (ECACC No. 99090925)；198/A1 (ECACC No. 99090924)；198/BB1 (ECACC No. 99090926)；193/AO (ECACC No. 99121614)；196/C4 (ECACC No. 99121615)；198/D1 (ECACC No. 99121616)；198/T2 (ECACC No. 99121617)；198/G2 (ECACC No. 99121618)；198/AC1 (ECACC No. 99121619)；および198/U2 (ECACC No. 99121620)。

【0055】

特定の抗体の生物学的特性の、より深い分析を行うために、FVIIII様活性を有する異なる抗体を発現する均一なハイブリドーマ細胞株を伸長し、そして目的の抗体をより大きなスケール（100～1000ml）で発現するために使用した。これらの抗体をアフィニティー精製し（実施例3を参照のこと）、その後、さらなる実験に使用した。

【0056】

（実施例3：FIX/FIXa 活性化活性を示す抗体の第IX因子/FIXa ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) 結合特性）

第IX因子ならびにFIXの2つの活性化形態（FIXa $\alpha$ およびFIXa $\beta$ ）（FIX/FIXa( $\alpha$ ,  $\beta$ ))を、2g/mlの最終濃度まで、TBS（25mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH7.5）に希釈した。Nunc Maxi sorp ELISAプレートを、標準的な手順（4℃、一晚）に従って、100 $\mu$ lのFIX/FIXa( $\alpha$ ,  $\beta$ )溶液でコートし、そしてTBST（TBS, 0.1% (v/v) Tween 20）で数回洗浄した。50 $\mu$ lのハイブリドーマ上清を、50 $\mu$ l TBST/2% BSAで1:1に希釈し、コートしたELISAプレートに添加した。室温（RT）で2時間のインキュベーション期間の後に、プレートをTBSTで4回洗浄し、そして100 $\mu$ l/ウェルの抗マウスIgG（Fc特異的）ペルオキシダーゼ結合体化抗体（Sigma, #A-0168）の1:25000希釈物（TBST/1% BSA



中)とともにインキュベートした(2時間、RT)。ウェルを、TBSTで5回洗浄し、そして最後に、 $100\mu\text{l}$ の新たに調製した染色溶液( $100\mu\text{l}$  OPD (60mg OPD/ $\text{ml}$ )および $10\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ を補充した $10\text{ml}$ の50mMクエン酸ナトリウム(pH5))で染色した。この反応を、50mlの $\text{H}_2\text{SO}_4$ の添加により停止させ、そしてその光学密度を、492nmおよび620nmにおいて、GENESIS<sup>TM</sup>ソフトウェアを使用して、Lab systems iEMS Reader MF<sup>TM</sup>マイクロタイタープレートリーダーで記録した。

#### 【0057】

特定の場合においては、抗マウスIgG ELISAの代わりに、抗マウスIgM ELISAを実施した。

#### 【0058】

(ハイブリドーマ細胞培養物上清からのマウスIgGの精製)

ハイブリドーマ上清(100~500ml)に、200mM Tris/HCl緩衝液(pH7.0)および固体NaClを補充して、それぞれ20mM Trisおよび3M NaClの最終濃度を得た。次いで、この上清を、5500×gにおける10分間の遠心分離によって、清澄化した。1mlのプロテインGアフィニティークロマトグラフィーカラム(Protein G Sepharose Fast Flow, Amersham-Pharmacia)を、15mlの20mM Tris/Cl(pH7.0)で洗浄し、そしてその後、3M NaClを含む10mlの20mM Tris/Cl緩衝液(pH7.0)で平衡化した。次いで、この3M NaClを含むハイブリドーマ上清を、重力によってこのカラムに装填した。このカラムを、3M NaClを含む15mlの20mM Tris/Cl緩衝液(pH7.0)で洗浄した。結合したIgGを、12mlのグリシン/HCl緩衝液(pH2.8)でさらに溶出し、そして1mlの画分を収集した。中和のために、 $100\mu\text{l}$ の1M Tris(pH9.0)を、各画分に添加した。IgGを含む画分を、マイクロプレートのウェル内で、 $50\mu\text{l}$ を $150\mu\text{l}$ の染色溶液(BioRad濃縮物、水で1:5に希釈)と混合することによって、同定した。陽性の画分を「ブルー」し、限外濾過

濃縮器デバイス (Centricon Plus 20, Amicon) によって、製造業者に従って、1ml に濃縮した。この濃縮物を、19ml TBS (150mM NaCl を含む 20mM Tris/Cl 緩衝液 (pH 7.0)) で希釈し、そして再度、1ml に濃縮した。IgG を TBS にするために、この希釈-濃縮工程を、さらに 2 回繰り返した。

#### 【0059】

(ハイブリドーマ細胞上清からのマウス IgM の精製)

100~500ml のハイブリドーマ細胞培養上清を、限外濾過濃縮器デバイス (Centricon Plus 20, Amicon) を用いて製造業者に従ってか、または硫酸アンモニウム沈殿 (40% 飽和, 0℃) およびこの沈殿物の 5~10ml の TBS への再溶解によってかのいずれかで、5~10ml に濃縮した。いずれの場合においても、この濃縮物を、1.25M NaCl を含む 20mM Tris/Cl 緩衝液 (pH 7.4) に対して透析し、そしてさらに、Centricon Plus 20 (Amicon) 限外濾過デバイスにおいて 1ml に濃縮した。IgM を、ImmunoPure IgM Purification Kit (Pierce) を用いて、製造業者に従って、この濃縮物から精製した。マルトース結合タンパク質カラムからの溶出の間に収集された画分を、IgM に関して試験し、ブールし、濃縮し、そして IgG に関して記載したように、TBS にした。

#### 【0060】

(精製した画製物における IgG 濃度の決定)

適切な希釈物の、全 IgG 内容物の 280nm 消光を、測定した。E280 = 1.4 は、1mg/ml のタンパク質に対応する。

#### 【0061】

(第 1Xa 因子特異的 IgG (定量的 ELISA))

マイクロプレート (Nunc MaxiSorp) のウェルを、TBS (150mM NaCl を含む 25mM Tris/HCl (pH 7.5)) に希釈された 2μg/ml の第 1Xa 因子とともに、4℃で一晩インキュベートした。ウェルを、TBST (150mM NaCl および 0.1% (v/v) Tween

20を含む25mM Tris/HCl (pH7.5)で4回洗浄した。標準モノクローナルABとして、HIX1抗FIX (精密)を使用した。標準およびサンプルを、2% (w/v) BSAを含むTBST中で希釈した。標準希釈系列およびサンプルの適切な希釈物を、ELISAプレート上で室温で2時間インキュベートした。プレートを、TBSTで4回洗浄し、そして抗マウスIgG (Fc特異的) ペルオキシダーゼ結合体化抗体 (Sigma, #A-0168) FIXaの100 $\mu$ l/ウェルの1:25000の希釈物 (TBST/1% BSA中) とともにインキュベートした (2時間、RT)。ウェルを、TBSTで5回洗浄し、そして最後に、100 $\mu$ lの新たに調製した染色溶液 (100 $\mu$ lのOPD (60mg OPD/ml) および10 $\mu$ lの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を補充した10ml 50mMクエン酸ナトリウム (pH5) ) で染色した。この反応を、50ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加により停止させ、そして30分後、光学密度を、492nmおよび620nmにおいて、Labsystems iEMS Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーによって、GENESIS™ソフトウェアを使用して、記録した。

#### 【0062】

(実施例4：色素形成FVIIIAッセイにおいてFVIIIA線活性を示す抗FIX/FIXa抗体)

いくつかの抗FIX/FIXa抗体産生ハイブリドーマクローンを、4回までサブクローニングし、そして得られるモノクローナルハイブリドーマ細胞株を使用して、モノクローナル抗体含有上清を産生した。これらの上清由来のIgGアイソタイプ抗体を、アフィニティークラムで精製し、そしてTBSに対して透析した (上記を参照のこと)。IgM抗体を、精製していない上清画分として使用した。以下の実験を、以下の2セットの代表的な抗体を使用して行った：193/AD3および198/AC1/1 (IgGアイソタイプ、抗体198/AC1/1は、親198/AC1ハイブリドーマクローンからの調製物であり、すなわち、198/AC1細胞を含む (凍結した) ウイルスが、培養され、そして抗体が産生される。次いで、この上清を、これらの実験のために使用する) ならびに196/AF2および196/AF1 (IgMアイソタイプ) (図6Aおよび図

6 B)。簡単に言えば、モノクローナル抗体を含むサンプル（精製されていないハイブリドーマ上清、または示される場合には、特定の量のF I X 特異的抗体）の25  $\mu$  l のアリコート、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃に升温させた。色素形成基質（S-2222）、合成トロピンインヒビター（I-2581）、第I X a 因子（F I X a）およびF X を、滅菌水中で再形成し、そしてF I X a / F X を、供給者のプロトコルに従って、リン脂質と混合した。1反応あたり、50  $\mu$  l のリン脂質 / F I X a / F X 溶液を、25  $\mu$  l のC a C l<sub>2</sub>（25 mM）および50  $\mu$  l の基質 / インヒビターカクテルと混合した。反応を開始させるために、125  $\mu$  l のプレミックス（p r e m i x）を、マイクロタイタープレート中のモノクローナル抗体溶液に添加し、そして37℃でインキュベートした。405 nmおよび490 nmにおける、サンプルの吸光度を、種々の時点において（5分～6時間）、試薬ブランク（ハイブリドーマ上清の代わりに細胞培養培地）に対して、L a b s y s t e m s i E M S R e a d e r M F<sup>TM</sup>マイクロタイタープレートリーダーによって、G E N E S I S<sup>TM</sup>ソフトウェアを使用して、読み取った。

#### 【0063】

ヒトF V I I I（12および16 mU / m l）、T B Sならびに細胞培養培地と比較した、モノクローナル抗体193 / A D 3（I g Gアイソタイプ）および196 / A F 2（I g Mアイソタイプ）により示されるF V I I I様活性の時間経過を、図6 Aに示す。405 nmの波長において測定可能な光学密度の増加により判断する場合に、誘導期の後に、両方の抗体が、色素形成基質切断を生じる。

#### 【0064】

ヒトF V I I I（16 mU / m l）および10  $\mu$  g / m l のマウスI g Gと比較した、モノクローナル抗体198 / A C 1 / 1（I g Gアイソタイプ、10  $\mu$  g / m l）および196 / A F 1（I g Mアイソタイプ、精製されていない上清）により示されるF V I I I様活性の時間経過を、図6 Bに示す。405 nmの波長において測定可能な光学密度の増加により判断する場合に、誘導期の後に、両方の抗体が、色素形成基質切断を生じる。

# 【0065】

(実施例5：抗FIX/FIXa-抗体により示されるFVII活性は、第Xa因子を産生し、そしてリン脂質、FIXa/FXおよびCa<sup>2+</sup>に依存性である。)

第VII因子活性は、通常、色素形成アッセイおよびまたはAPTTに基づく凝固アッセイを用いて、決定される。両方の型のアッセイは、FVIIa/FIXaにより媒介される第Xa因子産生に依存する。色素形成FVIIaアッセイの場合には、産生される第Xa因子は、引き続いて色素形成基質と反応し、これは、分光学的に(例えば、ELISAリーダーにおいて)モニタリングされ得る。APTTに基づく凝集アッセイにおいては、遊離の第Xa因子が、リン脂質表面におけるFVaと組み合わさって、いわゆるプロトロンビナーゼ複合体となり、そしてプロトロンビンをトロンビンへと活性化させる。トロンビンは、次に、フィブリン産生を生じ、そして最終的に、凝固の形成を生じる。これら2つのアッセイ系の中心は、FVIIa/FIXa複合体による第Xa因子の産生である。

# 【0066】

抗FIX/FIXa-抗体により示されるFVII活性が実際に第Xa因子を産生することを実証するために、以下の実験を実施した。精製されていないハイブリドーマ上清196/AF2(IgMアイソタイプ)のいくつかの25μlのアリコートを、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃まで昇温させた。ポジティブコントロールとして、16mUのRecombinate™を、ハイブリドーマ培地(196 HM 007/99)中に希釈し、そしてハイブリドーマ上清と全く同じ様式で処理した。ネガティブコントロールとして、純ハイブリドーマ培地を使用した。色素形成基質(S-2222)合成トロンビンインヒビター(1-2581)第IXa因子およびFXを、滅菌水中で再形成し、そしてFIXa/FXを、供給者のプロトコルに従って、リン脂質と混合した。Pefabloc Xa(登録商標)(第Xa因子特異的プロテイナーゼインヒビター)(Pentapharm, LTD)を、水で再形成して、最終濃度を1mM/1とした。1反応あたり50μlのリン脂質/FIXa/FX溶

液を、 $25\mu\text{l}$ の $\text{CaCl}_2$  ( $25\text{mM}$ ) および $50\mu\text{l}$ の基質／トロンビンインヒビターカクテルと混合した。反応を開始させるために、 $125\mu\text{l}$ のプレミックスを、マイクロタイタープレート中のサンプルに添加し、そして $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。示される場合には、 $35\mu\text{M}$ のPefabloc Xa（登録商標）を添加した。 $405\text{nm}$ および $490\text{nm}$ における吸光度を、種々の時点において（5分ごと〜6時間ごと）、試薬ブランド（細胞培養培地）に対して、Lab systems iEMS Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーによって、GENESIS™ソフトウェアを使用して、読み取った。

#### 【0067】

色素形成基質S-2222の容易に測定可能な切断により判断する場合の、IgM抗FIX/FIXa抗体196/AF2により示されるFVII様活性による、第Xa因子の産生における第IXa因子刺激の結果（「 $16\text{mU FVII}$ 」と「 $196/\text{AF2}$ 」とを比較のこと）を、図7Aに示す。第Xa因子活性は、FXa特異的インヒビター「Pefabloc Xa（登録商標）」により効果的にブロックされ（「 $196/\text{AF2}$ 」と「 $196/\text{AF2 } 35\mu\text{M Pefabloc Xa}$ （登録商標）」とを比較のこと）、このことは、実際にFXaが産生されたことを示す。

#### 【0068】

同じ実験を、クローン198/AM1の精製したIgG調製物を使用して、実施した（図7B）。精製されたIgGをTBSで希釈し、最終濃度を $0, 4\text{mg}/\text{ml}$ および $25\mu\text{l}$ （すなわち、合計 $10\mu\text{g}$ ）とし、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして $37^\circ\text{C}$ に昇温させた。ポジティブコントロールとして、 $6\text{mU}$ の血漿由来FVIIを使用した。 $10\mu\text{g}$ の非特異的マウスIgG（Sigma, 1-5381）は、ネガティブコントロールとして作用した。このアッセイを、上記のように実施した。

#### 【0069】

さらなる実験は、容易に測定可能な色素形成基質S-2222の切断により判断する場合に、IgG抗FIX/FIXa抗体198/AM1により示されるF

V I I I 様活性による第 I X a 因子の刺激が、第 X a 因子を産生することを示す (図 7 B)。再度、第 V I I I 因子および抗体 1 9 8 / A M 1 は、F X a を産生し、これは、F X a 特異的インヒビター「P e f a b l o c X a (登録商標)」によって効果的にブロックされる。ネガティブコントロールとして、非特異的マウス I g G ( S i g m a , 1 5 3 8 1 ) をアッセイした。

#### 【 0 0 7 0 】

別のセットの実験において、精製した抗 F I X / F I X a 抗体 ( I g M、図 8 A) または細胞培養物上清由来の精製していない抗体 ( I g G、図 8 B) のいずれかの F V I I I 様活性の、リン脂質 ( P L )、F I X a / F X および C a <sup>2+</sup> の存在への依存を、実証した。マウス I g G を、コントロールとして使用した (図 8 C)。第 V I I I 因子様活性を、本質的に上に記載のように、アッセイした。示される場合には、F I X a / F X 混合物、P L または C a <sup>2+</sup> のいずれかを、その反応から省略した。4 0 5 n m および 4 9 0 n m における、サンプルの吸光度を、種々の時点において、試薬ブランク (精製された抗体の代わりに緩衝液) に対して、L a b s y s t e m s i E M S R e a d e r M F <sup>TM</sup> マイクロタイタープレートリーダーで読み取った。その結果を図 8 A、図 8 B および図 8 C に示す。

#### 【 0 0 7 1 】

精製された抗 F I X a 抗体 1 9 8 / A C 1 / 1 ( I g G アイソタイプ、このアッセイを通して使用された濃度は 1 0 μ g / m l であった) の、リン脂質 ( P L )、F I X a / F X、および C a <sup>2+</sup> の存在下における F V I I I 様活性の依存性をさらに、図 8 A に示す。容易に認識可能であるように、競合的アッセイ (抗体、P L、C a <sup>2+</sup> および F I X a / F X を含む) のみが、穏当な F X a 生成を引き起こす。リン脂質、F I X a / F X、および C a <sup>2+</sup> の存在下における不純 I g M アイソタイプ抗 F I X / F I X a 抗体 ( 1 9 6 / A F 1 ) を含む細胞培養上清の F V I I I 様活性の依存性を、図 8 B に示す。

#### 【 0 0 7 2 】

重ねて、精製された I g G 調製物について既に示されたように (図 8 A)、抗体 1 9 8 / A C 1 / 1 は、競合的アッセイ ( P L、C a <sup>2+</sup> および F I X a / F X

を含む) のみが、適当な量の F I X a 生成を引き起こす。反応の特異性を実証するために、正常なマウス血漿から調製された総 I g G を、上記と同じ条件下でアッセイした。この結果を、図 8 C に示す。いかなる F V I I I 様活性も検出され得なかった。予期されたように、リン脂質、F I X a / F X、および  $Ca^{2+}$  の不在下において検出可能な活性は存在しない。すべての実験をマイクロタイタープレートにおいて実施し、そして O D 4 0 5 を、6 時間にわたって 5 分毎に走査した。

#### 【0073】

(実施例 6 : 特定の抗 F I X / F I X a 抗体は、F I X a の存在下において凝血原である)

正常なホメオシスの間、F I X はまず、組織因子 (T F) / 第 V I I a 因子経路によってか、または後に活性化第 X I 因子 (F I X a) によってかのいずれかで活性化となる。その活性化後、F I X a は、活性化 F V I I I との膜結合複合体において、血小板表面上で会合する。第 I X a 因子は単独では、F X に対する酵素活性をほとんどまたは全く有さないが、F V I I I a の存在下では、高度に活性となる。特定の抗 F I X / F I X a 抗体が、F V I I I 様活性を有し、従って、F V I I I を欠損したヒト血漿における凝血原であることを実証するために、以下の実験を行った。異なる量の抗体 1 9 3 / A D 3 またはマウス I g G (コントロールとして) を、標準的な a P T T に基づく一段階凝固アッセイにおいて使用した。簡潔には、1 0 0  $\mu$  l の抗体含有サンプルを、1 0 0  $\mu$  l の F V I I I 欠損血漿 (D P) および 1 0 0  $\mu$  l の D A P T T I N (活性化されたトロンボプラスチンの時間を決定するための P T T 試薬 ; I M M U N O A G) 試薬と共に、K C 1 0 A 凝固分析装置においてインキュベートした。示された場合では、総量 5 0 n g の活性化 F I X を、反応混合物中に含ませた。4 分間のインキュベーション後に、1 0 0  $\mu$  l の  $CaCl_2$  (2 5 m M) を添加することによって、反応を開始した。この結果を、表 1 および図 9 に示す。

#### 【0074】

【表 1】



# 凝固時間(秒)

| $\mu\text{g}$ AB | 193/AD3   | マウス IgG  |
|------------------|-----------|----------|
|                  | 50ng FIXa | 50ngFIXa |
| 9                | 101.6     | 102.5    |
| 4.5              | 95.6      | 103.2    |
| 2.25             | 93.1      | 103.2    |
| 1.8              | 93.7      | 101.9    |
| 1.35             | 91.4      | 103.4    |
| 0.9              | 94.4      | 102.2    |
| 0.45             | 98.1      | 101.9    |
| 0.34             | 97.1      | 103.9    |
| 0.23             | 99.3      | 103.7    |

表1: 50ngの活性化FIX (0.01U FIX) の存在下で、種々の量の凝血原(193/AD3)およびコントロール抗体(マウスIgG)を使用するAPTTに基づく凝固アッセイにおけるFVII欠損血漿の凝固時間。反応および活性化FIXにおける抗体のモル比は、10:1である。抗体と総FIX (FIXおよびFIXa、ヒトFVII欠損血漿が1U (5 $\mu\text{g}$ ) のFIXを含むと仮定) との間のモル比は、6:1 (反応における9 $\mu\text{g}$ の抗体) と1:6 (反応における0.23 $\mu\text{g}$ の抗体) との間で変動する。凝固時間の最適な短縮化に際して、抗体と総FIXとの間のモル比は、1:1である。FIXaの添加を伴わない凝固時間は、120秒間の範囲である。

## 【0075】

図9は、50ngの活性化FIXの存在下で、種々の量の凝血原(193/AD3)およびコントロール(マウスIgG)抗体を使用するAPTTに基づく凝固アッセイにおけるFVII欠損血漿の凝固時間のグラフ表示である。抗体193/AD3を補充したサンプルには、明らかな凝固時間の用量依存的減少が存在する。これらの結果は、抗体193/AD3が、FIXaの存在下において凝血原であることを意味する。

## 【0076】

(実施例7: 抗FIX/FIXa抗体は、FVIIインヒビターおよびFI

Xaの存在下において凝血原である)

標準的なFVII置換療法の高価な合併症が、FVIIに対する同種抗体の発達であり、これは、FVIIの中和へと導き、そして患者の血液が凝固しないという状態に導く。

#### 【0077】

特定の抗FIXa抗体が、FVIIインヒビターの存在下においてさえ、FVII様活性を有するということを実証するために、以下の実験を行った。異なる量の抗体193/AD3またはコントロールとしてのマウスIgGを、標準的なAPTTに基づく一段階凝固アッセイにおいて使用した。簡潔には、100  $\mu$ lの抗体サンプルを、100  $\mu$ lのFVII欠損血漿(図10A)またはFVIIインヒビター血漿(インヒビター効力400 BU/ml)(図10B)のいずれか、および100  $\mu$ lのDAPTTIN試薬と共に、KC10A凝固分析装置においてインキュベートした。さらに、総量50 ngの活性化FIXaを、反応混合物に含ませた。4分間のインキュベーション後に、100  $\mu$ lのCaCl<sub>2</sub>(25 mM)を添加することによって、反応を開始した。等価な条件を確実にするために、FVII欠損血漿およびFVIIインヒビター血漿を使用する実験を、並置して実施した。この結果を、図10Aおよび10Bに示す。実施例6において既に示したように、FVIIインヒビターの存在下で抗体193/AD3を補充したサンプルには、明らかな凝固時間の用量依存的減少が存在する。

#### 【0078】

(実施例8: 抗FIX/FIXa抗体は、欠損性FVIIおよびFIXaの存在下において凝血原である)

特定の抗FIXa抗体が、欠損性FVIIの存在下においてFVII様活性を有することを実証するために、以下の実験を実施し得る。漸増量の抗体193/AD3、またはコントロールとしてのマウスIgGを、標準的なAPTTに基づく一段階凝固アッセイにおいて使用する。この凝固アッセイでは、欠損性FVII(DF8)の存在に起因して非常に低い凝固活性を有する血友病Aの患者の血漿を、使用する。簡潔には、100  $\mu$ lの抗体サンプルを、100  $\mu$ lの

DF8血漿またはFVII欠損性血漿のいずれか、および100 $\mu$ lのDAPTIN試薬と共に、KC10A凝固分析装置においてインキュベートする。さらに、総量50ngの活性化FIXaを、反応混合物に含ませた。短期間のインキュベーション後に、100 $\mu$ lのCaCl<sub>2</sub>（25mM）を添加することによって、反応を開始した。等価な条件を確実にするために、FVII欠損血漿およびDF8血漿を使用する実験を、並置して実施する。

#### 【0079】

（実施例9：FIXaの存在下において凝血原活性を有する抗FIX/FIXa抗体は、ヒトFIXaとウシFIXaとの間を識別する）

198回目の融合実験から選択されたFIX/FIXa特異的モノクローナル抗体を、個々のハイブリドーマ上清から精製し、そして実施例3に記載のように定量した。これらの抗体を、改変された一段階凝固アッセイ（実施例6に記載のような）において分析した。そしていくつか、凝血原活性を示した。

#### 【0080】

これらの抗体調製物の色素形成活性を、以下のFIXa生成動力学的アッセイにおいて測定した：10 $\mu$ gのモノクローナル抗体（25 $\mu$ l中）を、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃まで加温した。色素形成基質（S-2222）、合成トロンビンインヒビター（I-2581）、第IXa因子、およびFIXを、滅菌水中で再構築し、そしてFIXa/FIX（両方ともウシ）を、供給業者のプロトコールに従って、リン脂質と混合した。反応につき、50 $\mu$ lのリン脂質/FIXa/FIX溶液を、25 $\mu$ lのCaCl<sub>2</sub>（25mM）および50 $\mu$ lの基質/インヒビター反応濃液と組み合わせた。反応を開始するために、125 $\mu$ lのプレミックスを、マイクロタイタープレート中におけるモノクローナル抗体溶液に添加し、そして37℃でインキュベートした。サンプルの405nmおよび490nmでの吸光度を、GENESIS™ソフトウェアを使用するLab systems iEMS Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーにおいて、試薬ブランク（モノクローナル抗体の代わりに、25ml TBS）に対して種々の時点（5分間～2時間）で読み取った。並行して、反応あたり50ngのヒトFIXaを添加したことを除いて、同じ反応を実施

した。凝血原性を示したこれらの抗体は、ウシFⅨの場合では色素形成活性を有さなかったが、ヒトFⅨaが存在した場合は、高い活性を示した。

#### 【0081】

図11は、50ngのヒトFⅨaβの添加あり（+）および添加なし（-）でモノクローナル抗体198/A1、198/B1、および198/AP1によって示されたFⅢ活性の時間経過を示す。非特異的ポリクローナルマウスIgGを、コントロールとして使用した。198/A1および198/B1は、凝血原性を示す（実施例6における198/AD3と類似）が、198/AP1は示さない。抗体198/BB1は、同じ活性パターンを有した（データは示さず）。

#### 【0082】

198回目の融合実験から選択された、さらなるモノクローナル抗体としては、198/D1（ECACC番号 99121616）、198/T2（ECACC番号 99121617）、198/G2（ECACC番号 9912118）、198/U2（ECACC番号 99121620）が挙げられる。

#### 【0083】

（実施例10：抗FⅨ/FⅨa抗体から誘導された抗体誘導体の構造および凝血原活性；ハイブリドーマ細胞株193/AD3、193/K2、198/A1および198/B1（クローンAB2）からの抗体可変ドメインのサブクローニング）

クローニング手順：「QuickPrep（登録商標）Micro mRNA Purification Kit」（Pharmacia）を製造業者の指示書に従い使用して、メッセンジャーRNAを、個々の細胞株（193/AD3、193/K2、198/A1または198/B1（クローンAB2）のいずれか）の1×10<sup>6</sup>個のハイブリドーマ細胞から調製した。対応するcDNAを、「Ready-To-Go-You-Prime-First-Strand Beads kit」（Pharmacia）を製造業者の指示書に従い使用して、mRNAのレトロ（retro）転写によって生成した。重鎖および軽鎖をコードする配列を、プライマーセットを使用して、対応するcDNAに変換した。

重鎖特異的mRNA (VH) を逆転写するために、以下のオリゴヌクレオチドの等モル混合物を使用した (RTmix1) : MOCG1-2FOR (5' CTC C AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC 3') (配列番号1)、MOCG3FOR (5' CTC GAT TCT CTT GAT CAA CTC AGT CT 3') (配列番号2) および、MOCMFOR (5' TGG AAT GGG CAC ATG CAG ATC TCT 3') (配列番号3)。同じ反応チューブにおいて、軽鎖特異的cDNA (VL) を、プライマーMOCKFOR- (5' CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT GAC 3') (配列番号4) を使用して合成した。

#### 【0084】

VHについてのコード配列を、図12に示したプライマーセットおよびテンプレートとして上記の逆転写混合物 (RTmix1) 由来の特異的cDNAを用いるPCRによって増幅した。VK鎖遺伝子を、図13に示したプライマーセットを使用し、そしてまたテンプレートとしてRTmix1を用いて増幅した。VH-PCR産物を、SfiI-AseIで切断し、そしてSfiI-AseIで消化したベクターpDAP2 (GeneBank登録番号: U35316) に挿入した。これにより得られたpDAP2-VH構築物を、それぞれ、pDAP2-193AD3/VH、pDAP2-198A1/VH、pDAP2-198AB2/VH (抗体198/B1由来) およびpDAP2-193/K2/VHと命名した。引き続いて、プラスミドをAseI-NotIで切断し、そして対応するAseI-NotI消化されたVK遺伝子のPCR産物を挿入した。結果として生じたベクターをpDAP2-193/AD3scFv、pDAP2-198/A1scFv、pDAP2-198/AB2scFv (抗体198/B1由来) およびpDAP2-193/K2scFvと命名した。これらは、モノクローナル抗体193/AD3、198/A1、198/AB2 (抗体198/B1由来) および193/K2のVH遺伝子およびVL遺伝子をコードする。重鎖および軽鎖を、人工的可撓性リンカー (G<sub>4</sub>SGGRASG<sub>4</sub>S; Engelhardtら, 1994) についてのコード配列に連結し、そして個々の抗体のscFv

改変体の発現を可能にする。

【0085】

図14では、ハイブリドーマ細胞株193/AD3由来のscFvのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～357は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド358～402は、人工的可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド403～726は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列YGNSPKGFAY（配列番号5）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G<sub>4</sub>SGGRASG<sub>4</sub>S）を示す。

【0086】

図15では、ハイブリドーマ細胞株193/K2由来のscFvのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～363は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド364～408は、人工的可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド409～747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3のタンパク質配列は、配列DGGHGYGSSFDY（配列番号6）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G<sub>4</sub>SGGRASG<sub>4</sub>S）を示す。

【0087】

図16では、ハイブリドーマ細胞株198/AB2（抗体198/B1由来）由来のscFvのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～366は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド367～411は、人工的可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド412～747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列EGGGFTVNWYFDV（配列番号7）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G<sub>4</sub>SGGRASG<sub>4</sub>S）もまた示す。

【0088】

図17では、ハイブリドーマ細胞株198/A1由来のscFvのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～366は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド367～411は、人工的可撓性リンカーをコードし、

そしてスクレオチド412〜747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列EGGGYYVNWYFDV（配列番号8）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G<sub>4</sub>SGGRASG<sub>4</sub>S）もまた示す。

【0089】

（実施例11：抗FIX/FIXa抗体のCDR3領域由来のペプチドの凝血原活性）

原理上、抗体分子は、三次元空間におけるペプチドエレメントのコンビナトリアルアレイの提示のための生物学的デバイスとして想定され得る（Gaoら、1999、PNAS、96：6025を参照のこと）。従って、抗体（または抗体誘導体（例えば、scFv、Fabなど））を特定の標的タンパク質の機能的に重要なドメインの検出のためのツールとして、または他方で、特定の相互作用を特異的に媒介する（すなわち、生物学的基質FXに対するFIXaの活性を活性化または増強する）アミノ酸配列を描写（delineation）するためのいずれにも使用され得る。後者のプロセスは、FIXa増強剤としての、多数の重鎖CDR3領域（CDR3<sub>H</sub>）由来ペプチド配列の評価へと導いた。

【0090】

このような活性を示すペプチドの凝血原活性の増強は、FIXa活性の増強を媒介するために重要なペプチド領域における配列改変を通して達成され得る。増強された凝血原活性を有するペプチド配列への可能な工程として、FIXa分子上の抗体の結合部位（すなわち、198/A1または198/B1）を、配列比較分析、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析および競合的ELISA分析を使用することによってマッピングする。FIXの結晶構造が既知であるので、引き続いて、分子モデリングを使用して、すなわち、ヒトFIXa上の198/B1結合部位における198/B1由来ペプチドの適合を改善する。

【0091】

他方で、例えば、「アラニンスキャニング変異分析（alanine scanning mutational analysis）」によって、所定のペプチド配列（例えば、198/A1または198/B1 CDR3<sub>H</sub>由来のペプ

チド配列)の秩序的 (methodical) 変異分析によって、凝血原活性に重要なペプチド残基の同定が可能となる。特定のペプチド配列の活性を改善するための別の方法は、高スループットスクリーニングと組み合わせたペプチドライブラリーの使用である。

【0092】

抗体の抗原結合部位は、VL-HLダイマー (またはFv領域) のN末端の近位する6つの「相補的決定領域 (complement determining region) (CDR)」に由来する。所定の抗原に対する抗体特異性に対する単一のCDRの寄与は、非常に多様であり得るが、一般に、重鎖のCDR3領域 (CDR3<sub>H</sub>) が特に影響する。すなわち、CDR3<sub>H</sub>領域の特定のタンパク質配列が抗原認識に非常に重要であり得ると考えられる。CDR3<sub>H</sub>領域の長さは、非常に多様であることが報告されており、4~25アミノ酸の範囲である (Borrebaeck, 16頁)。

【0093】

ペプチド配列の系統的な変異分析の例を以下に示す。抗FIX/FIXa抗体のCD3領域由来のペプチドの可溶性/凝血促進性 (procoagulant) 効率を改善するために、N末端およびC末端のアミノ酸配列を変化させた。さらに、一連の変異ペプチドを構築しそして分析した。

【0094】

このような研究の原理を、抗体198/A1および198B/1のCDR3<sub>H</sub>領域由来の一連のペプチドによって例示する。それぞれ、元のペプチドA1 (表2を参照のこと) は、抗体198/A1のCDR3<sub>H</sub>領域に由来し、そしてペプチドB1は、抗体198B/1のCDR3<sub>H</sub>領域由来に由来する (実施例10、図16および17を参照のこと)。用語「スクランブルバージョン (scrambled version)」とは、ペプチドが、同じアミノ酸をランダムな順序で有することを意味する。

【0095】

【表2】



| ペプチド             | 配列                                    | アミノ酸   | MW<br>(D) | pI  | 特性                                      |
|------------------|---------------------------------------|--------|-----------|-----|---|
| A1               | EGGGYYVNWYFDV<br>(配列番号 9)             | (13aa) | 1569      | 7.2 | 高pIの<br>可溶性                             |
| A1/1             | VYGFVGWGYEVNDY<br>(配列番号 10)           | (13aa) | 1569      | 7.1 | A1のスクラン<br>バージョン                        |
| A1/2             | EEEGGGYYVNWYFDEE<br>(配列番号 11)         | (18aa) | 2244      | 5.8 | 酸性の pI,<br>可溶性                          |
| A1/3             | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 12)       | (18aa) | 2407      | 9.9 | 塩基性の pI,<br>可溶性                         |
| A1/4             | EYGEYGEVNEYDEFWE<br>(配列番号 13)         | (18aa) | 2244      | 5.8 | A1/2のスクラン<br>バージョン                      |
| A1/5             | VYRNRNRWGYRGRFGDE<br>(配列番号 14)        | (18aa) | 2407      | 9.9 | A1/3のスク<br>ランバージョン                      |
| A1/3-<br>scr3    | RRRGEYGVYWGDFYRRR<br>(配列番号 15)        | (18aa) | 2407      | 9.9 | A1/3のスクラン<br>バージョン                      |
| A1/3-Rd          | RdRdRdEGGGYYVNWYFDRdRdRd<br>(配列番号 16) | (18aa) | 2407      | 9.9 | L-Argを<br>D-Argに置換<br>した A1/3 -<br>A1/3 |
| A1/3-<br>Rd-srmb | RdRdRdGEYGVYWGDFYRdRdRd<br>(配列番号 17)  | (18aa) | 2407      | 9.9 | A1/3-Rdの<br>スクランバージョン                   |

(表2)

一連の抗体198/A1由来ペプチドのリスト。ペプチドの長さ (a a, アミノ酸数)、算出した分子量 (MW, ダルトン (D)) および統計学的等電点 (pI) をリストする。D-Arg は、Rd と省略する。

[0096]

第1のシリーズの実験において、本発明者らは、元のCDR3<sub>H</sub>ペプチドのC末端Val残基を除去し、そしてN末端およびC末端にいくつかの荷電残基を付加することによって、その元のCDR3<sub>H</sub>ペプチド配列 (A1; EGGGYYVNWYFDV) の可溶性を改善した。得られたペプチドA1/2 (酸性のpI)、A1/3 (塩基性のpI) およびこれらのそれぞれのスクランバージョンA1/4、A1/5およびA1/3scr3は、生理学的pHで種々の緩衝液系

において容易に可溶性であった。

#### 【0097】

これらのペプチドのFV I I I様(FIXa活性化)活性を分析するために、市販のFV I I Iアッセイに基づくアッセイ系を開発した(実施例2および4を参照のこと)。この基本的原理は、FIXaが、補因子なしで、その天然の基質FXに対する非常に限定された活性を有することである。FIXa活性化特性を有する基質(すなわち、FV I I IまたはFV I I I様活性を示す基質)の存在下でのみ、実質的な量のFIXaが、FIXa/アクチベーター複合体を介するFXの切断によって生成される。生成されたFIXaの量を、色素形成性の基質の切断によってモニターする。この改正した色素形成アッセイの原理を、2つの代表的なペプチドA1/3およびA1/5(表2)について記載する。簡単に言うと、ペプチドストック溶液(イミダゾール緩衝液(IZ)(50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH7.2)中の25μlのアリコートを、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃に温めた。供給者のプロトコルに従って、色素形成性のFIXa基質(S-2222)、合成トロンビンインヒビター(1-2581)、ウシFIXaおよびウシFXを、滅菌水中で再構成し、そしてFIXa/FXを、リン脂質と混合した。これらのペプチドは、ウシFIXaとは反応しないので、(Testキット中のウシFXとの混合物として生じる)2.9nM(多くの場合では、2.3nM)のヒトFIXa(ERL)を添加した(実施例11、図19を参照のこと)。反応あたり、50μlのこのリン脂質/FIXa/FX溶液を、25μlのCaCl<sub>2</sub>(25mM)および50μlの基質/インヒビター濃液と合わせた。反応を開始するために、この125μlのプレミックスを、マイクロタイタープレート中のペプチド溶液に添加し、37℃でインキュベートした。サンプルの405nmおよび490nmの吸光度を、GENESIS™ソフトウェアを使用するLab systems iMES Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーにおいて、試薬プランクに対して種々の時点で(5分~2時間)で読み取った。この実験の結果を、実施例11、図18に示す。ペプチドA1/3は、2.9nMのヒトFIXaの存在下で容易に測定可能なFIXa生成を誘導したが、そのスクランブルバージョン

ンA1/5は、不活性であった。さらに、酸性ペプチドA1/2およびそのスクランブルバージョンA1/4およびA1/3-scr3は、匹敵する条件下で試験した場合に、有意な色素形成活性を付与しなかった（データは示さず）。このペプチドA1/3様の親抗体198/A1が、ウシF IXaおよびFXと反応しないことを証明するために、図19に示す実験を行った。ペプチドA1/3を、2.3 nMのヒトF IXa (hF IXa) と共に (A1/3 (24 μM)、+ hF IXa)、または伴わずに (A1/3 (24 μM)、w/o hF IXa)、上記のようにインキュベートした。コントロール実験において、本発明者らは、反応混合液に、2.3 nMのhF IXaを補充したそのままの希釈緩衝液 (IZ) を添加した。図19に示されるように、反応は、ヒトF IXaの存在下でのみ生じる。

#### 【0098】

図18は、2.9 nMのヒトF IXa (hF IXa) の存在下でのペプチドA1/3の色素形成性F V I I I様活性を実証する。ペプチドA1/3のスクランブルバージョンであるペプチドA1/5は、FXaの生成を生じない。図19は、ヒトF IXa (hF IXa) の存在に対する、ペプチドA1/3の色素形成性のF V I I I様活性の依存性を実証する。ヒトF IXaの非存在下で、ペプチドA1/3は、FXaの生成を生じない。緩衝液コントロールであるそのままのイミダゾール緩衝液をIZと示す。

#### 【0099】

これらのペプチドをまた、F V I I I欠乏血漿において凝固時間を減少するその能力について分析した。a P T Tベースの1段階の凝固アッセイを、本質的には、記載（実施例6を参照のこと）のように行った。凝固時間（反応が開始してから「凝固」が形成するまでの時間）を、F V I I I、緩衝液コントロール (IZ) またはコントロールペプチド（スクランブルバージョン）のいずれかに対して比較した。2つの異なるa P T T試薬（D A P T T I NおよびP a t h r o m t i n S L）を用いて行った、2つの代表的な凝固実験の結果を、表3Aおよび表3Bに示す。

#### 【0100】

【表3】

| 例           | ペプチド濃度       | w/o FIXa sec | w/o FIXa sec | 平均 (sec) | 2.2nM FIXa sec | 2.2nM FIXa sec | 平均 (sec) |
|-------------|--------------|--------------|--------------|----------|----------------|----------------|----------|
| 1           |              |              |              |          |                |                |          |
| I2          | 0            | 107,7        | 106,8        | 107      | 93,1           | 94,5           | 94       |
| A1/3        | 15 $\mu$ M   | 78,2         | 77,1         | 78       | 59,3           | 59,9           | 60       |
|             | 12,5 $\mu$ M | 80,2         | 80,6         | 80       | 60,2           | 58,9           | 60       |
|             | 7,5 $\mu$ M  | 97,8         | 97,9         | 98       | 73,1           | 72,7           | 73       |
|             | 2,5 $\mu$ M  | 105,2        | 104,8        | 105      | 91,1           | 91             | 91       |
| A1/3 - scr3 |              |              |              |          |                |                |          |
|             | 15 $\mu$ M   | 122,5        | 122          | 122      | 106,1          | 105,5          | 106      |
|             | 12,5 $\mu$ M | 116          | 117,6        | 117      | 103,1          | 104,5          | 104      |
|             | 7,5 $\mu$ M  | 114,2        | 113,9        | 114      | 100,8          | 100,6          | 101      |
|             | 2,5 $\mu$ M  | 107,8        | 107,4        | 108      | 96,3           | 95,2           | 96       |
| 例           |              |              |              |          |                |                |          |
| 2           |              |              |              |          |                |                |          |
| I2          | 0            | 111          | 109,7        | 110      | 94,7           | 95,5           | 95       |
| A1/3        | 12,5 $\mu$ M | 83,6         | 85,5         | 85       | 56,7           | 56,7           | 57       |
|             | 10 $\mu$ M   | 79,1         | 78,5         | 79       | 63,1           | 62,5           | 63       |
|             | 7,5 $\mu$ M  | 100,1        | 100,5        | 100      | 71,6           | 73,9           | 73       |
|             | 5 $\mu$ M    | 103,4        | 104,8        | 104      | 77             | 76             | 77       |
|             | 2,5 $\mu$ M  | 110,1        | 108,9        | 110      | 88             | 88,8           | 88       |
|             | 1,25 $\mu$ M | 108,7        | 109,3        | 109      | 90,7           | 90,8           | 91       |

表3A. 2. 2 nMのヒトFIXaの存在下または非存在下 (w/o) のいずれかにおけるFVII欠乏血症におけるペプチドA1/3およびA1/3-scr (A1/3のスクランブルバージョン) の凝固活性。2つの独立した代表的な実験 (実験1および実験2) を示す。全ての凝固実験を2連で行った。個々の実験についての凝固時間を取り、平均凝固時間を秒 (sec.) で表す。表3Aに示す実験は、aPTT試薬DAPTTIN (Baxter Hyland Immunco) を使用して行った。緩衝液コントロール (I2、イミダゾール緩衝液) に比べて、ペプチドA1/3は、凝固時間における用量依存性の減少を生じた。この凝固時間の減少は、この反応混合液に対する2. 2 nMの活性化ヒトFIXの添加によってさらに明らかとなった。ペプチドA1/3のスクランブルバージョンA1/3-scr3は、凝固時間の減少を示さなかった。実際に、2. 5  $\mu$ Mよりも高い濃度では、このスクランブルペプチドは、阻害性になり、

従って、凝固時間を延長した。ペプチドA1/1、A1/2、A1/4およびA1/5は、凝固時間の減少を生じず、これは、これらが、凝血促進活性を欠いていることを示す（データは示さず）。

【0101】

【表4】

| 最終濃度  |           | w/o<br>FIXa<br>sec | w/o<br>FIXa<br>sec | 平均<br>sec | 2.2nM<br>FIXa<br>sec | 2.2nM<br>FIXa<br>sec | 平均<br>sec |
|-------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|
| IZ    | 0         | 131,8              | 132,1              | 132       | 107,9                | 108,7                | 108       |
|       |           |                    |                    |           |                      |                      |           |
| FVIII | 12,5mU/ml | 68,9               | 69                 | 69        | 52,9                 | 53,6                 | 53        |
|       | 6,25mU/ml | 77,8               | 77,9               | 78        | 58,6                 | 58,9                 | 59        |
| A1/3  |           |                    |                    |           |                      |                      |           |
|       | 15μM      | 152,8              | 149,3              | 151       | 75,4                 | 75,2                 | 75        |
|       | 10μM      | 135,7              | 134,6              | 135       | 76,2                 | 79,8                 | 78        |
|       | 5μM       | 152,6              | 155,6              | 154       | 86,6                 | 90,2                 | 88        |
|       | 1μM       | 138,3              | 138,8              | 139       | 103,7                | 105,9                | 105       |

表3B. Pathromtin SL (DADE Behring) をaPTT試薬として使用する場合のFVIII欠乏血漿におけるペプチドA1/3の凝固活性。実験を、2.2nMのヒトFIXaの存在下または非存在下（w/o）のいずれかで、2連で行った。個々の実験についての凝固時間を取り、平均凝固時間を秒（sec.）で表す。第VIII因子およびミダゾール緩衝液（IZ）を、それぞれ、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして含んだ。

【0102】

表3Aに示した実験と対照的に、表3Bに示した実験は、aPTT試薬Pathromtin SLを使用して行った。FIXaの存在下で、ペプチドA1/3は、凝固時間の用量依存性の減少を生じたが、FIXaの非存在下では、凝固時間の減少は検出されなかった。

【0103】

別のシリーズの実験において、本発明者らは、ペプチドA1／3の血漿安定性（例えば、タンパク質分解からの保護）を改善することを行った。1つのアプローチは、N末端およびC末端のL-A r g 残基のD-A r g 残基での置換である（ペプチドA1／3-r d およびA1／3-R d-s r m b によって例示される）。次いで、ペプチドA1／3-r d およびA1／3-R d-s r m b（このペプチドA1／3-r d のスクランブルバージョン）を、色素形成性およびa P T T ベースの凝固アッセイにおいて分析した。これらの実験は、末端L-A r g 残基のD-A r g 残基での交換が、色素形成アッセイにおいて測定されたようなF V I I 様活性を変化しないことを示し、これは、このA r g 残基のキラリティーが、色素形成活性において主な役割を果たしていないことを示す（図20）。さらに、a P T T ベースのI 段階の凝固活性は、幾分減少されたが、なお容易に検出可能であった（表4）。

【0104】

【表5】

|              | ペプチド<br>濃度    | w/o<br>FIXa<br>sec | w/o<br>FIXa,<br>sec | 平均<br>sec | 2.2nM<br>FIXa<br>sec | 2.2nM<br>FIXa<br>sec | 平均<br>sec |
|--------------|---------------|--------------------|---------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|
| I Z          | 0             | 110                | 109, 1              | 110       | 96                   | 96                   | 96        |
| A1/3         | 15 $\mu$ M    | 77, 8              | 78                  | 78        | 56, 1                | 55, 5                | 56        |
|              | 12, 5 $\mu$ M | 99, 4              | 100, 5              | 100       | 65                   | 68                   | 67        |
|              | 10 $\mu$ M    | 104, 4             | 104, 5              | 104       | 72                   | 73, 2                | 73        |
|              | 7, 5 $\mu$ M  | 105, 2             | 105, 2              | 105       | 80, 7                | 80, 5                | 81        |
|              | 5 $\mu$ M     | 108, 4             | 107, 7              | 108       | 89, 7                | 88, 3                | 89        |
|              | 2, 5 $\mu$ M  | 107, 9             | 107, 6              | 108       | 93, 6                | 93, 3                | 93        |
|              | 1, 25 $\mu$ M | 106, 7             | 107                 | 107       | 94, 4                | 95                   | 95        |
| A1/3-Rd      | 15 $\mu$ M    | 96, 4              | 95, 4               | 96        | 76, 1                | 74, 4                | 75        |
|              | 12, 5 $\mu$ M | 98                 | 98, 6               | 98        | 72, 3                | 73, 7                | 73        |
|              | 10 $\mu$ M    | 93, 5              | 95, 8               | 95        | 74, 2                | 77, 2                | 76        |
|              | 7, 5 $\mu$ M  | 97, 6              | 98, 1               | 98        | 80, 9                | 82, 2                | 82        |
|              | 5 $\mu$ M     | 99, 2              | 99, 1               | 99        | 86                   | 85, 1                | 86        |
|              | 2, 5 $\mu$ M  | 102, 7             | 103, 4              | 103       | 94, 4                | 94, 7                | 95        |
|              | 1, 25 $\mu$ M | 107, 5             | 107, 7              | 108       | 96, 6                | 96                   | 96        |
| A1/3-Rd-srmb | 15 $\mu$ M    | 121, 9             | 121, 3              | 122       | 112, 7               | 112, 4               | 113       |
|              | 12, 5 $\mu$ M | 117, 2             | 118                 | 118       | 108, 1               | 107, 8               | 108       |
|              | 10 $\mu$ M    | 115, 8             | 115, 3              | 116       | 107, 2               | 107, 8               | 108       |
|              | 7, 5 $\mu$ M  | 114, 6             | 113, 5              | 114       | 107, 6               | 106, 6               | 107       |
|              | 5 $\mu$ M     | 113, 1             | 112, 4              | 113       | 108, 5               | 108, 2               | 108       |
|              | 2, 5 $\mu$ M  | 111, 9             | 111, 9              | 112       | 105                  | 104, 2               | 105       |
|              | 1, 25 $\mu$ M | 107, 2             | 107, 1              | 107       | 101, 1               | 105, 3               | 103       |

表4 ペプチドA1/3、A1/3-RdおよびA1/3-Rd-srmb（配列は、表2を参照のこと）の1段階の凝固活性。I Z（緩衝液コントロール）。

#### 【0105】

図20は、ペプチドA1/3-Rdの変化されない色素形成活性を実証する。12 $\mu$ Mの最終濃度のペプチドまたは緩衝液コントロール（I Z）を、2.3 nMのヒトFIXa（+）の存在下でインキュベートした。ペプチドA1/3およびA1/3-Rdの色素形成活性は、実質的に変化されることが示され、そしてこの色素形成アッセイにおいてはほぼ同一の結果を生じた。A1/3のスクランブルバージョン、A1/5および緩衝液は、有意なFIXa生成を生じなかった。

#### 【0106】

次のシリーズの実験において、本発明者らは、各々の残基のアミノ酸アラニン

での置換による、このペプチドコア配列の任意のアミノ酸の個々の役割を決定することをを行った（表5）。

【0107】

【表6】



| アミノ酸                | 配列                              | 分子量        | PI       | 注記       |                                  |
|---------------------|---------------------------------|------------|----------|----------|----------------------------------|
| (D)                 |                                 |            |          |          |                                  |
| A1/3                | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 18) | (18aa<br>) | 240<br>7 | 9,<br>9  | 糖基化PI,<br>耐毒性                    |
| A1/3-<br>13         | RRRAGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 19) | (18aa<br>) | 234<br>9 | 10<br>.4 | E <sub>1</sub> -A <sub>1</sub>   |
| A1/3-<br>1          | RRREGAGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 20) | (18aa<br>) | 242<br>1 | 9,<br>9  | G <sub>2</sub> -A <sub>2</sub>   |
| A1/3-<br>2          | RRREGAGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 21) | (18aa<br>) | 242<br>1 | 9,<br>9  | G <sub>3</sub> -A <sub>3</sub>   |
| A1/3-<br>3          | RRREGGAYVNWYFDRRR<br>(配列番号 22)  | (18aa<br>) | 242<br>1 | 9,<br>9  | G <sub>4</sub> -A <sub>4</sub>   |
| A1/3-<br>4          | RRREGGGAYVNWYFDRRR<br>(配列番号 23) | (18aa<br>) | 231<br>5 | 9,<br>9  | Y <sub>5</sub> -A <sub>5</sub>   |
| A1/3-<br>5          | RRREGGGYAVNWYFDRRR<br>(配列番号 24) | (18aa<br>) | 231<br>5 | 9,<br>9  | Y <sub>6</sub> -A <sub>6</sub>   |
| A1/3-<br>6          | RRREGGGYYANWYFDRRR<br>(配列番号 25) | (18aa<br>) | 237<br>9 | 9,<br>9  | V <sub>7</sub> -A <sub>7</sub>   |
| A1/3-<br>7          | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 26) | (18aa<br>) | 236<br>4 | 9,<br>.9 | N <sub>8</sub> -A <sub>8</sub>   |
| A1/3-<br>8          | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 27) | (18aa<br>) | 229<br>2 | 9,<br>9  | W <sub>9</sub> -A <sub>9</sub>   |
| A1/3-<br>9          | RRREGGGYYVNWAFDRRR<br>(配列番号 28) | (18aa<br>) | 231<br>5 | 9,<br>9  | Y <sub>10</sub> -A <sub>10</sub> |
| A1/3-<br>10         | RRREGGGYYVNWYADRRR<br>(配列番号 29) | (18aa<br>) | 233<br>1 | 9,<br>9  | F <sub>11</sub> -A <sub>11</sub> |
| A1/3-<br>11         | RRREGGGYYVNWYFARRR<br>(配列番号 30) | (18aa<br>) | 236<br>3 | 10<br>.5 | D <sub>12</sub> -A <sub>12</sub> |
| A1/3-<br>12sxm<br>b | RRRYVYNGWGYFEGARRR<br>(配列番号 31) | (18aa<br>) | 236<br>3 | 10<br>.4 | アミノ酸<br>バージョン                    |

表5. ペプチドコア配列 (E<sub>1</sub>G<sub>2</sub>G<sub>3</sub>G<sub>4</sub>Y<sub>5</sub>Y<sub>6</sub>V<sub>7</sub>N<sub>8</sub>W<sub>9</sub>Y<sub>10</sub>F<sub>11</sub>D<sub>12</sub>) 内の任意の単一のアミノ酸の役割を解明するために設計されたペプチドを列挙する。下の枠の番号は、そのペプチド内のアミノ酸の位置を記載する。アラニン (荷電

していない小さなアミノ酸)で、各アミノ酸を置換した(「アラニンスキャン」)。ペプチドの長さ(アミノ酸数)、分子量計算値(MW(ダルトン(D)))および統計的等電点(pI)もまた列挙される。

【0108】

各ペプチドを、それぞれイミダゾール緩衝液(50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH 7.2)に溶解し、続いて凝固緩衝液(50mM イミダゾール、100mM NaCl、1% ヒトアルブミン、pH 7.4)中、所望の最終濃度まで希釈した。これらのペプチドをその色素形成活性について、およびそのFVII欠損血症における凝固時間を減少する能力について分析した。一段階凝固アッセイを本質的に記載されるように(実施例6を参照のこと)行った。凝固時間(反応の開始から「凝塊」形成までの時間)を、緩衝液コントロールまたはコントロールペプチドのいずれかに対して比較した(スクランブルバージョン)。「アラニンスキャン」のいくつかの結果をペプチドA1/3-2およびA1/3-3について示す。ペプチドA1/3-2で例示される場合のG<sub>3</sub>-A<sub>3</sub>の変化は、2.2nMのヒトFXaの存在下で、高い色素形成活性および一段階凝固時間の強い減少(12.5μMの濃度で34秒)を生じる。ペプチドA1/3-3(G<sub>4</sub>-A<sub>4</sub>)は、より高いかまたはより低い濃度での減少した活性と共に、12μM付近の最終濃度での最適の色素形成活性を示す。このペプチドは、FXaの非存在下でのより高い濃度(12.5μM)での一段階凝固アッセイにおいていくらか抑制性であるが、2.2nMのFXaの存在下では強く活性になる(31秒、12.5μM)。

【0109】

次の一連の実験において、本発明者らは、各コア残基をアミノ酸であるグルタミン酸(E)で置換することにより、ペプチドコア配列の任意のアミノ酸の個々の役割を決定するように設計した(表6を参照のこと)。

【0110】

【表7】

| ペプチド        | 配列                              | アミノ酸   | MW<br>(D) | pI  | 備考                               |
|-------------|---------------------------------|--------|-----------|-----|----------------------------------|
| A1/3        | RRREGGGYYVNWYFDRRR              | (18aa) | 2407      | 9.9 | 塩基性 pI,                          |
| A1/3-22     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 32) | (18aa) | 2479      | 9.5 | G <sub>2</sub> -E <sub>2</sub>   |
| A1/3-23     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 33) | (18aa) | 2479      | 9.5 | G <sub>3</sub> -E <sub>3</sub>   |
| A1/3-24     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 34) | (18aa) | 2479      | 9.5 | G <sub>4</sub> -E <sub>4</sub>   |
| A1/3-26     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 35) | (18aa) | 2373      | 9.4 | Y <sub>5</sub> -E <sub>5</sub>   |
| A1/3-27     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 36) | (18aa) | 2373      | 9.4 | Y <sub>6</sub> -E <sub>6</sub>   |
| A1/3-28     | RRREGGGYYVNWYFDRRR<br>(配列番号 37) | (18aa) | 2437      | 9.5 | Y <sub>7</sub> -E <sub>7</sub>   |
| A1/3-29     | RRREGGGYYVWYFDRRR<br>(配列番号 38)  | (18aa) | 2422      | 9.5 | N <sub>8</sub> -E <sub>8</sub>   |
| A1/3-30     | RRREGGGYYVWYFDRRR<br>(配列番号 39)  | (18aa) | 2350      | 9.5 | W <sub>9</sub> -E <sub>9</sub>   |
| A1/3-31     | RRREGGGYYVWYFDRRR<br>(配列番号 40)  | (18aa) | 2373      | 9.4 | Y <sub>10</sub> -E <sub>10</sub> |
| A1/3-32     | RRREGGGYYVWYFDRRR<br>(配列番号 41)  | (18aa) | 2389      | 9.5 | F <sub>11</sub> -E <sub>11</sub> |
| A1/3-33     | RRREGGGYYVWYFERRR<br>(配列番号 42)  | (18aa) | 2421      | 9.9 | D <sub>12</sub> -E <sub>12</sub> |
| A1/3-34srmb | RRRGEYGEYWGDFYRRR<br>(配列番号 43)  | (18aa) | 2437      | 9.5 | スライムタンパク質                        |

表6. ペプチドコア配列 (E<sub>1</sub>G<sub>2</sub>G<sub>3</sub>G<sub>4</sub>Y<sub>5</sub>Y<sub>6</sub>V<sub>7</sub>N<sub>8</sub>W<sub>9</sub>Y<sub>10</sub>F<sub>11</sub>D<sub>12</sub>) 内の任意の単一のアミノ酸の役割を解明するために設計されたペプチドを列挙する。下の枠の番号は、そのペプチド内のアミノ酸の位置を記載する。グルタミン酸 (食に荷電した大きなアミノ酸) で、このコア配列の各アミノ酸を置換した (「グルタミン酸スキャン」)。ペプチドの長さ (アミノ酸数)、分子量計算値 (MW (ダルトン (D))) および統計的等電点 (pI) もまた列挙される。

[0111]

各ペプチドを、それぞれイミダゾール緩衝液 (50 mM イミダゾール、100 mM NaCl、pH 7.2) に溶解し、続いて凝固緩衝液 (50 mM イミダゾール、100 mM NaCl、1% ヒトアルブミン、pH 7.4) 中 所望の最終濃度まで希釈した。一連の「グルタミン酸スキャン」由来のペプチド

をその色素形成FV I I I様活性について、およびそのFV I I I欠損血症における凝固時間を減少する能力について分析した。一段階凝固アッセイを本質的に記載されるように（実施例6を参照のこと）行った。

【0112】

ペプチドA1/3-24は、いくつかの興味深い特性を示した。この分子は、高色素形成FV-I I I様活性を6. 5  $\mu$ M~12  $\mu$ Mの間の濃度で示したが、より高い濃度（24  $\mu$ Mまで）では失活した。このペプチドは、ヒトF I X aの非存在下では凝血促進活性を有していなかったが、2. 2 nMのh F I X aの存在下では強く活性であった。

【0113】

第2の一連の実験において、本発明者らは、ペプチド配列B1由来の抗体198/B1 CDR3Hの凝血促進活性を改善するように設計した。第1の工程において、本発明者らは、元のペプチド配列（B1; EGGGFTVNWYFDV）の溶解性を、C末端V a 1残基を除去し、そしていくつかの荷電した残基をこのペプチドのN末端およびC末端に付加することにより改善した。得られたペプチドB1/4、B1/6（酸性 pI）、B1/7（塩基性 pI）およびそのスクランブルされたバージョンB1/5、B1/7 s c r 3は、生理学的pHにおいて種々の緩衝液系に容易に可溶である。

【0114】

【表8】

| ペプチド     | 配列                               | アミノ酸数  | MW<br>(D) | pI  | 備考                               |
|----------|----------------------------------|--------|-----------|-----|----------------------------------|
| B1       | EGGGFTVNWYFDV<br>(配列番号 44)       | {13aa} | 1491      | 6,0 | 減少して溶解性                          |
| B1/4     | REGGGFTVNWYFDR<br>(配列番号 45)      | {14aa} | 1704      | 7,9 | 可溶                               |
| B1/5     | FGVGYRGETRNFWD<br>(配列番号 46)      | {14aa} | 1704      | 8,0 | スクランブル...<br>...バージョン<br>...可溶   |
| B1/6     | EEEEGGGGFTVNWYFDEEE<br>(配列番号 47) | {18aa} | 2166      | 5,0 | 酸性 pI<br>可溶                      |
| B1/7     | RRREGGGFTVNWYFDRRR<br>(配列番号 48)  | {18aa} | 2329      | 9,9 | 塩基性 pI<br>可溶                     |
| B1/7scr3 | RRRFGVGYGETRNFDRRR<br>(配列番号 49)  | {18aa} | 2329      | 9,9 | 塩基性 pI,<br>可溶<br>スクランブル<br>バージョン |

表7は、一連の抗体198/B1誘導ペプチドのリストである。ペプチドの長さ (aa、アミノ酸数)、分子量計算値 (MW、ダルトン (D)) および等電点 (pI) が列挙される。

#### 【0115】

ペプチドB1/4およびB1/5は、50mM Tris、100mM NaCl、pH=6.5に可溶であった。両方のペプチドを、色素形成FVIIIAッセイにおいて分析した。ペプチドB1/4は、いくらかの色素形成活性（データは示されず）を有することが見出されたが、スクランブルバージョンB1/5では見いだされなかった。

#### 【0116】

続いて、ペプチドB1/6、B1/7およびB1/7scr3を分析した。各ペプチドを、それぞれ50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH 7.2に溶解し、そして続いて凝固緩衝液（50mM イミダゾール、100mM NaCl、1%ヒトアルブミン、pH 7.4）またはイミダゾール緩衝液のいずれか中に所望の最終濃度まで希釈した。これらのペプチドをその色素形成活性およびFVIIIA欠損血症における凝固時間を減少する能力について分析した（表8および9）。一段階凝固アッセイを、本質的に記載されるとおり（実験例6を参照のこと）行った。凝固時間（反応の開始から「凝塊」形成までの時

間)を、緩衝液コントロールまたはコントロールペプチドのいずれかに対して比較した(スクランブルバージョン)。

#### 【0117】

ペプチドB1/7由来のF I X a 活性化活性(F V I I I 補因子様活性)を、最初に上記の色素形成アッセイにおいて測定した。

#### 【0118】

図21に示されるように、2.4  $\mu$ M ペプチドB1/7の反応混合物への添加は、十分に測定可能なF X a の生成をもたらした。対照的に、35  $\mu$ M のP e f a b l o c k X a (F X a プロテアーゼ活性の特異的インヒビター)の添加は、色素形成基質切断反応の有意な減少(図22)を生じ、それにより実際にペプチド-F I X a 媒介F X a 生成をもたらした。F I X a およびF X の反応混合物への添加がない場合、F X a は合成されなかった(図22)。ペプチドB1/6およびコントロールペプチドB1/5およびB1/7 s c r 3は、活性を示さなかった(データは示さず)。

#### 【0119】

図21は、ペプチドB1/7の色素形成活性を実証する。最終濃度2.4  $\mu$ M でのペプチドまたは緩衝液コントロール(I Z)を2.3 nM のヒトF I X a の存在下でインキュベートした。

#### 【0120】

図22において、最終濃度2.4  $\mu$ M でのペプチドB1/7または緩衝液コントロール(I Z)でのペプチドを2.3 nM のヒトF I X a の存在下でインキュベートした(「+2.3 nM h F I X a」、または「+」のいずれかとして示される)。ペプチドB1/7の色素形成活性は、F I X a およびF X の存在に依存することが見出された。なぜならば、F I X a およびF X が反応から離される場合(w/o F I X a /F X)、反応が全く検出できないからである。ペプチドB1/7が実際にF X a 生成を媒介することを立証するために、F X a 特異的プロテアーゼインヒビターP e f a b l o c X a を反応混合物に添加した(35  $\mu$ M P e f a b l o c X a)。第2の一連の実験において、ペプチドB1/6、B1/7およびB1/7 s c r 3の凝血促進効果を、a P T Tベースの1

工程凝固アッセイにおいて試験した。これらの実験を本質的に実施例6に記載の通りに行った。結果を表8および9に示す。

[0121]

【表9】

| ペプチド     | 12,5 $\mu$ M<br>(-) | 1.25 $\mu$ M<br>(-) | 0.125 $\mu$ M<br>(-) | 12,5nM<br>(-) | 緩衝液<br>(-) | 備考 |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------|------------|----|
| B1/6     | 115                 | 110                 | 111                  | 111           | 110        |    |
| B1/7     | 157                 | 112                 | 109                  | 110           | 110        |    |
| B1/7scr3 | 115                 | 105                 | 106                  | 105           | 107        |    |

表8：FVII欠損血漿を、ペプチドB1/6、B1/7scr3またはB1/7のいずれかと共に活性化ヒトFIXの非存在下でインキュベートした。ネガティブコントロールとして、純粋な緩衝液を欠損血漿に添加した。種々の組合せについての凝固時間を示す。これらの条件下で、その最高濃度（12.5 $\mu$ M）におけるペプチドB1/7は、157秒という延長した凝固時間により示されるように、凝固プロセスに対して抑制性になる。

[0122]

【表10】

| ペプチド     | 12,5 $\mu$ M<br>(+) | 1.25 $\mu$ M<br>(+) | 0.125 $\mu$ M<br>(+) | 12,5nM<br>(+) | 緩衝液<br>(+) | 備考 |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------|------------|----|
| B1/6     | 103                 | 100                 | 101                  | 100           | 100        |    |
| B1/7     | 83                  | 92                  | 99                   | 99            | 100        |    |
| B1/7scr3 | 102                 | 94                  | 94                   | 94            | 94         |    |

表9：FVII欠損血漿を、ペプチドB1/6、B1/7scr3またはB1/7のいずれかと共に、活性化ヒトFIXの存在下でインキュベートした。ネガティブコントロールとして、純粋な緩衝液をこの欠損血漿に添加した。凝固時間を種々の組合せについて示す。FIXaの存在下において、ペプチドB1/7は、減少した凝固時間（スクランブルペプチドについて102秒、および緩衝液コントロールについて100秒と比較して83秒）により示されるように凝血促進性になる。

【0123】

(実施例12：FVIIIIインヒビター血漿における抗FIX/FIXa抗体のCDR3領域から得られるペプチド誘導体の凝血促進活性)

FVIIIIインヒビター血漿におけるペプチドA1/3の凝血促進活性についてアッセイするために、以下の実験を実行した。本発明者らは、一段階凝固アッセイをベースとする標準aPTTを行ったが、FVIIII欠損血漿の代わりに、本発明者らはFVIIIIインヒビター血漿を採用した。血漿の阻害性能力は、1 mlあたり8.1 Bethesda ユニットであった。

【0124】

【表11】

|      |            | w/o<br>FIXa | w/o<br>FIXa |     |  | FIXa | FIXa |         |
|------|------------|-------------|-------------|-----|--|------|------|---------|
|      | ペプチド<br>濃度 | 秒           | 秒           | 秒   |  | 秒    | 秒    | 平均<br>秒 |
| I2   | 0          | 104,8       | 103,6       | 104 |  | 94,2 | 94,1 | 94      |
| A1/3 | 12,5μM     | 85,8        | 85,3        | 86  |  | 61   | 60,2 | 61      |
|      | 10μM       | 88,4        | 87,9        | 88  |  | 61,3 | 61,8 | 62      |
|      | 7,5μM      | 93,7        | 92,7        | 93  |  | 68,8 | 70,9 | 70      |
|      | 5μM        | 101,5       | 101,1       | 101 |  | 81   | 82   | 82      |
|      | 2,5μM      | 106,1       | 105,3       | 106 |  | 90,2 | 90,5 | 90      |
|      | 1,25μM     | 104,5       | 104,3       | 104 |  | 91,3 | 91,4 | 91      |

表10：種々の量のペプチドA1/3 (12.5 μM ~ 1.25 μM) をFVIIIIインヒビター血漿に (2.2 nMのFIXaの存在下 (FIXa) または非存在下 (w/o FIXa) のいずれかで) 添加した。ネガティブコントロールとして、純粋な緩衝液を血漿に添加した (I2)。実験を2回行い、そして平均 (aver.) を算出した。凝固時間 (秒) を種々の組合せについて示す。ペプチドA1/3が、(用量依存性の様式で) FVIIIIインヒビター血漿の凝固時間を、FIXaの存在下で、たとえば非常に少ない程度でも、またFIXaの非存在下でも減少させることは容易に理解できる。

【0125】

(実施例13：196/C4 IgMのIgG1への変換)



いくつかのIgM抗体は高FV11様活性を色素形成アッセイにおいて示すので、このようなIgM抗体をIgG抗体に(Fab、F(ab)2、scFvなどのような抗体誘導体もまた産生され得るが)変換させようと試みた。IgM可変領域遺伝子のレスキューが以下に詳細に記載される。発現ベクターpBax-IgG1(図23)を、ベクターpSI(Promega)およびpEF/Bsd(Invitrogen)から複数のクローニング工程を介して最初に構築した。ドナーのBリンパ球を血液から精製し、そして成熟mRNAを「micro-mRNA purification-kit」(Pharmacia)を使用してこれらの細胞から精製した。ヒトκ鎖およびヒトγ1鎖のcDNAを、「you-prime first-strand-cDNA-kit」(Pharmacia)を採用して特異的プライマーを使用して調製した。

#### 【0126】

ヒトκ軽鎖定常ドメインのコード配列を、PCRにより特異的プライマーを使用してcDNAから増幅する。

#### 【0127】

ヒトγ1鎖定常領域(CH1-ヒンジ-CH2-CH3)の遺伝子を、PCRにより特異的プライマーを使用して増幅する。

#### 【0128】

軽鎖定常ドメインの軽鎖のPCR産物を、XbaIおよびNheIを用いて消化し、そして消化されたpSI中に挿入した。得られたベクターをEcoRIおよびXbaIを用いて切断し、そしてアニーリングされたオリゴヌクレオチドを挿入し、ベクターpSI-Cκを生じた。アニーリングされたオリゴヌクレオチドは、κ鎖可変領域挿入のためのリーダー部位およびSacI-XbaI部位を提供する。ヒトγ1鎖定常領域のPCR産物を、SpeIおよびBamHIを用いて消化し、そして消化されたpSIに挿入する。得られたベクターをSpeIおよびNotIで切断し、そしてアニーリングされたオリゴヌクレオチドを挿入して、ベクターpSI-Cγを生じる。アニーリングされたオリゴヌクレオチドは、重鎖可変領域の挿入のためのリーダー部位およびXhoI-BstEI部位を提供する。ベクターpEF/BsdをNheIおよびSfiIで消化し、Kl

enow処理により平滑末端にし、そしてpSI-C $\kappa$ 全体の発現カセット（BgIIおよびBamHIを用いて切除される）を（Klenow処理の後に）挿入する。得られたベクターをEcoRIおよびHindIIIを用いて消化し、そしてKlenow処理する。pSI-C $\gamma$ の全体の発現カセットをBgIIおよびBamHIで切除し、そして挿入する（Klenow処理後）。得られたベクターをpBax-IgG1と称する。

#### 【0129】

軽鎖可変領域をSacI-XbaI部位の間に挿入し得、 $\kappa$ 軽鎖の完全コード配列を得る。重鎖可変領域を、XhoI-BstEII部位の間にクローニングし得、完全IgG1重鎖遺伝子を生じる。両方のオープンリーディングフレームは、SV40プロモーターの制御下で発現され、シグナルペプチドのコード配列を、遺伝子の5'末端において小胞体への重鎖および軽鎖の分泌のために含む。COS細胞へのトランスフェクションは、親IgMと同じ結合特性を有するIgG1の発現を可能にする。プラスミドpBax-196/C4の構築は、特異的プライマーを使用するPCRにより196/C4 scFvのVH（実験10において記載されるようにサブクローニングされる）を増幅することによりさらに達成される。PCR産物を、XhoIおよびBstEIIを用いて消化し、そしてXhoIおよびBstEII消化pBax-IgG1に挿入する。196/C4 scFvのVLを、特異的プライマーを使用するPCRにより増幅する。PCR産物をSacIおよびXbaIを用いて消化し、そしてSacIおよびXbaI消化pBax-IgG1-VHに挿入する。得られたベクター（pBax-196/C4）をエレクトロポレーションによりCOS細胞にトランスフェクトし、そして親IgMと同じ特異性を有するハイブリッドIgG1分子（マウス可変領域およびヒト定常領域）が発現される。

#### 【0130】

（実施例14：抗FIXa抗体によるFIXaアミド分解活性の活性化：）

手短に言うと、20 $\mu$ lの第IXa因子（200mUのFIXa（Stago）を含む）を、200 $\mu$ lの反応緩衝液（50mM TrisHCl pH7.4, 100mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>および40%エチレングリコー

ル)、25  $\mu$ l の F I X a 基質 ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHG-Gly-Arg-pNA}$ , AcOH, 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , Pentapharm LTD) と共に、種々の量の抗 F I X 抗体 198/B1 (1 g G アイソタイプ) または 196/AF1 (1 g M アイソタイプ) の存在下または非存在下で、37℃ でインキュベートした。F I X a 基質の特異的切断を、E L I S A リーダーにおいて 405 nm でモニターした。抗 F I X 抗体の存在は、F I X a のアミド分解活性を少なくとも 2 倍増大した。図 24 は、抗体 198/B1 (図 24 A) および抗体 198/AF1 (図 24 B) の存在下での F I X a のアミド分解活性の増加を示す。

#### 【0131】

(実施例 15: 抗 F I X / F I X a-抗体由来の F a b フラグメントによって示される F V I I I 様活性)

抗 F I X / F I X a 抗体の F a b フラグメントを、標準的プロトコルに従って調製し、そして精製した。手短に言うと、1 ml の抗体 198/A1 (50 mM のイミダゾール中に 4 mg / ml, 100 mM NaCl, pH 7.4) を、87  $\mu$ l の細分緩衝液 (1 M Naアセテート, 10 mM EDTA 6.7, 5 mg / ml L-ヒスチジン) および 0.25 mg のパバイン (アガロースビーズ上に固定化) と共に一晩 37℃ でインキュベートした。この調製物を濾過してパバインを除去した。L-ヒスチジンを添加し (最終濃度 50 mM)、そしてその後 pH を 7.0 に調整した。最後に、固体の NaCl を添加して、1 M の最終濃度を得た。引き続いて、198/A1 F a b フラグメントを、プロテイン L に結合させることによって精製した: 本発明者らは、PHARMACIA XK16/20 カラム (ゲル容量: 2 ml) 中の ImmunoPure Immobilized PROTEIN L Plus (Pierce) を使用し、クロマトグラフィーのための緩衝液は以下のものであった: 1) 平衡緩衝液: 50 mM L-ヒスチジン pH 7.0; 1 M NaCl; 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; 2) 洗浄緩衝液: 50 mM L-ヒスチジン pH 7.0; 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; 3) 溶出緩衝液: 100 mM グリシン pH 2.5; 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; および 4) 中和緩衝液: 2 M Tris/Cl pH 8, 0;

クロマトグラフィーは、本質的に表11に記載される以下の工程1～7によって行った。溶出緩衝液の低いpHを中和するために、「画分チューブ (Fraction-tube)」を、0.2ml 2M Tris pH8.0と共に予めロードした。

【0132】

【表12】

|    | 工程      | 緩衝液   | 流速      | 容量   | CV  | 画分      |
|----|---------|-------|---------|------|-----|---------|
| 1. | カラム洗浄   | 溶出緩衝液 | 2.0ml/分 | 10ml | 5   | 廃棄      |
| 2. | 平衡化     | 平衡緩衝液 | 2.0ml/分 | 10ml | 5   | 廃棄      |
| 3. | サンプルロード | サンプル  | 1.0ml/分 | x ml | x   | 貫流      |
| 4. | 洗浄1     | 平衡緩衝液 | 1.0ml/分 | 20ml | 10  | 貫流      |
| 5. | 洗浄2     | 洗浄緩衝液 | 1.0ml/分 | 10ml | 5   | 貫流      |
| 6. | 溶出      | 溶出緩衝液 | 1.0ml/分 | 15ml | 7.5 | 1.0ml画分 |
| 7. | 中和      | 洗浄緩衝液 | 2.0ml/分 | 10ml | 5   | 廃棄      |

表11

最後の198/A1 Fab調製物を、50mMイミダゾール、100mM NaCl、pH7.4に対して透析し、そして上記のような色素形成 (chromogenic) FVIIIIアッセイにおいて分析した (図25)。インタクトな抗体と比較して、この198/A1 Fabフラグメントはある程度低い活性を有していたが；このFabフラグメントは依然としてFIX依存性FXa産生を生じた。図25は、2.3nMのヒトFIXaの存在下での抗体198/A1

Fabフラグメントの色素形成FVIIII様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らはインタクトな抗体198/A1ならびに7.5pMのFVIIIIを使用した。198/A1 FabフラグメントまたはFVIIIIの代わりに、緩衝液コントロール (IZ) をネガティブコントロールとして使用した。

### 【0133】

(実施例16:抗F I X / F I X a抗体のおよびE. c o l iアルカリホスファターゼのs c F vフラグメント間の融合タンパク質によって示されるF V I I I様活性)

抗体198/B1 (サブクローンAB2)の単鎖F vフラグメント(実施例10を参照のこと)を、pDAP2ベクター系を用いてE. c o l iアルカリホスファターゼのN末端に融合した(Kers chbaumerら、1996)。2つの同一のクローンを単離し、そしてpDAP2-198AB2#1およびpDAP2-198AB2#100と名付けた(図26)。得られた融合タンパク質をE. c o l i中で発現し、金属親和性クロマトグラフィー(Kers chbaumerら、1997)によって精製し、そして標準的な色素形成アッセイにおいて分析した(図27)。図27は、2.3 nMのヒトF I X aの存在下での2つの抗体198/B1 (サブクローンAB2) s c F vフラグメント-アルカリホスファターゼ融合タンパク質(198AB2#1および198AB2#100)の色素形成F V I I I様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らは7.5 pM F V I I Iを使用した。

### 【0134】

(実施例17:二価のミニ抗体によって示されるF V I I I様活性)

二価のミニ抗体を得るために、抗体198/B1 (サブクローンAB2)のs c F vフラグメントを、pZ i p lベクター系を用いて両親媒性らせん構造に融合した(Kers chbaumerら(Analytical Biochemistry 249, 219-227, 1997))。手短かに言うと、198/B1 s c F vフラグメントの遺伝子を、S f i lおよびN o t Iでの消化によってプラスミドpDAP-198AB2#100(実施例16)から単離した。このDNAフラグメントをゲル精製し、そしてS f i l/N o t I消化ベクターpZ i p lに挿入した。得られたプラスミドを配列決定し、そしてpZ i p l-198AB2#102と名付けた(図28)。並行して、本発明者らは、#8860と呼ばれる無関係のモノクローナル抗体からミニ抗体の異形を構築した。最初の段階において、抗体#8860の単鎖F vフラグメントを、ベクターpDAP

2内に構築した。このクローニングを、本質的には実施例10に記載されるように行った。この構築物をpDAP2-8860scFv#11と名付けた(図29)。pDAP2-8860scFv#11内に含まれるscFvフラグメントの、プラスミドpZip1(上記を参照のこと)へのサブクローニングは、ミニ抗体構築物p8860-Zip#1, 2を生じた(図30)。抗体#8860はFIX/FIXaとは反応しないので(ウェスタンブロットおよびELISA分析により判断)、これは適切なネガティブコントロールを表す。その後、このミニ抗体タンパク質をE. coliにおいて発現させ、そして以下のプロトコルに従うプロテインLへの結合によって細菌の上清から精製した:

アフィニティークロマトグラフィーについて、本発明者らは、4mlのゲル容量を有するPHARMACIA XK 16/20カラムにおいて、Immuno Pure Immobilized PROTEIN L Plus (Pierce)を使用した。使用した緩衝液は以下のものであった: 1) 平衡緩衝液: 50mM L-ヒスチジン pH7.0, 1M NaCl, 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; 洗浄緩衝液: 50mM L-ヒスチジン pH7.0, 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; 溶出緩衝液: 100mMグリシン pH2.5, 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; および中和緩衝液: 2M Tris/Cl pH8.0。

#### [0135]

サンプルを以下のように調製した: 細菌培養物の上清を、細菌発現培養物の遠心分離(11,000×g, 4℃, 10分)によって得た。470gの硫酸アンモニウムを1リットルの上清に加え、そしてこの溶液を氷上で1時間攪拌してタンパク質を沈殿させた。この沈殿を、2℃, 14,000×gの35分間によってペレット化し、そして100mlの20mM Tris pH7.0に再溶解させた。その後、この濃縮物を20mMのTris pH7.0に対して透析し、50mMの最終濃度までL-ヒスチジンを添加し、そしてpHを7.0に調節した。最後に、固体のNaClを添加し、1Mの最終濃度を得た。カラムにロードする前に、サンプルをまず室温、16,000×gで15分間遠心分離し、次いで0.45μmの滅菌フィルタを通して濾過した。

#### [0136]

クロマトグラフィーを、表12に記載される以下の工程1～7によって本質的に行った。溶出緩衝液の低いpHを中和するために、「画分チューブ (Fraction-tube)」を、0.2ml 2M Tris pH8.0と共に予めロードした。

【0137】

【表13】

|    | 工程      | 緩衝液   | 流速      | 容量   | CV  | 画分       |
|----|---------|-------|---------|------|-----|----------|
| 1. | カラム洗浄   | 溶出緩衝液 | 2.0ml/分 | 20ml | 5   | 廃棄       |
| 2. | 平衡化     | 平衡緩衝液 | 2.0ml/分 | 20ml | 5   | 廃棄       |
| 3. | サンプルロード | サンプル  | 1.0ml/分 | x ml | x   | 貫流       |
| 4. | 洗浄1     | 平衡緩衝液 | 1.0ml/分 | 40ml | 10  | 貫流       |
| 5. | 洗浄2     | 洗浄緩衝液 | 1.0ml/分 | 20ml | 5   | 貫流       |
| 6. | 溶出      | 溶出緩衝液 | 1.0ml/分 | 30ml | 7.5 | 1.0ml 画分 |
| 7. | 中和      | 洗浄緩衝液 | 2.0ml/分 | 20ml | 5   | 廃棄       |

表12.最後の198/B1 (サブクローンAB2) ミニ抗体調製物 (198 AB-Zip #102と名付けた) およびネガティブコントロールの8860-Zip #1.2を、50mMイミダゾール、100mM NaCl、pH7.4に対して透析し、そして上記のように色素形成FVIIIAッセイにおいて分析した (図31)。

【0138】

図31に見られ得るように、ミニ抗体構築物198AB-Zip #102は、実質的なFXa産生を生じた (FVIIIAと比較して)、一方、ネガティブコントロールミニ抗体8860-Zip #1.2は生じなかった。図31は、2.3nMのヒトFIXaの存在下での、198/B1 (サブクローンAB2) ミニ抗体198AB-Zip #102の色素形成FVIIIA様活性を実証する。ポジ

ティブコントロールとして、本発明者らは4.8 pMのFV111を使用し、一方、無関係のミニ抗体(8860-Zip#1.2)および単純反応緩衝液(plain reaction buffer)(IZ)はネガティブコントロールとして役立った。

#### 【0139】

(実施例18:抗FIXa/FIX抗体scFvフラグメントによって示されるFV111様活性)

抗体198/B1(サブクローンAB2)の単鎖Fvフラグメントならびに抗体#8860のscFvフラグメントを、pMycHis6ベクター系を用いて発現させた。ベクターpMycHis6(図32&33)を、ベクターpCCK(Engelhardtら, 1994, Biotechniques, 17: 44-46)をNotIおよびEcoRIで切断し、そして以下のオリゴヌクレオチドの挿入によって構築した: mychis6-co: 5' ggccgcag aacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggcgggcacatcaccatcaccatcactaataag3' (配列番号79) および mycchis-ic: 5' aattcttatttagtgatggatgatggatgtgccgccccattcagatcctctcttgagatgagttttgttctgc3' (配列番号80)。図32は、プラスミドpMycHis6の略図を示す。c-mycタグ配列は、ELISAまたはウエスタンブロット分析においてscFvフラグメントを検出するために使用される(Evanら, Mol. Cell. Biol., 1985, 5(12), pp. 3610-6)。His6タグ配列は、金属イオンクロマトグラフィーによるscFvフラグメントの精製を容易にするために含まれる(Hochuliら, 1988, Biotechnology, 6: 1321-1325)。このプラスミドは、lacZ遺伝子プロモーター(PlacZ)、PelBリーダー配列(図26の説明文を参照のこと)、E. coli複製起源(colEori)およびM13ファージ複製起源(M13ori)を含む。特異的選択を可能にするために、このプラスミドはまた、抗生物質アンピシリンに対する耐性を媒介する酵素β-ラクタマーゼのための遺伝子(AmpR)を保有す



る。198/B1 (クローンAB2) - scFv の遺伝子を、SfiI および NotI で消化して、そして SfiI/NotI 切断された pMycHis6 に挿入することによって、プラスミド pDAP2-198AB2#100 (実施例16) からレスキューした。得られたプラスミドを pMycHis-198AB2#102 と名付けた。図34は、198AB2 scFv のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列 (c-myc-タグおよび His6-タグに連結した) を示す: 発現ベクターの得られた ORF を、pMycHis6-198AB2#102 と名付けた。ベクター pMycHis6 を、ベクター pCOCK (Engelhardt O. ら, BioTechniques 17, 44-46, 1994) NotI-EcoRI を切断し、そして以下のアニールされたオリゴヌクレオチドを挿入することによって構築した: (5' -GGCCGCAGAACAA AACTCATCTCAG AAGAGGATCTGAATGGGGCGGCACATCACCATCACCATCACTAATAAG-3' (配列番号103) および 5' -TTATTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCCGCCCATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC TGC-3' (配列番号104))。得られたベクター (pMycHis6 と名付けた) は切断された SfiI-NotI であり、そして scFv 198AB2 の遺伝子を、ベクター pDAP2-198AB2#100 からこのベクターに交換した。198AB2 構築物に対する類似性において、#8860 scFv フラグメントを、pDAP2-8860 scFv クローン11 と名付けたプラスミドからクローンした。#8860 の純粋な scFv タンパク質を、8860-M/H#4c と名付けた (プラスミド p8860-M/H#4c、図35)。scFv タンパク質を E. coli 中で発現させ、そしてプロテイン L カラム上の細菌の上清から親和性精製した (実施例17を参照のこと)。最後の MycHis-198AB2#102 および 8860-M/H#4c 調製物を、50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH7.4 に対して透析し、そして上記のように色素形成 FVIL アッセイにおいて分析した (図36)。

#### 【0140】

図36において見られ得るように、scFv 構築物 MycHis-198AB

2#102は、実質的なFXaの産生を生じるが、一方、ネガティブコントロール8860-M/H#4cおよび単純反応緩衝液(IZ)は生じない。図36は、2.3nMのヒトFXaの存在下での、198/B1(サブクローンAB2)scFvフラグメント(My cHis-198AB2#102)の色素形成FVII様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らは4.8pMのFVIIを使用し、一方、無関係のscFv(8860-M/H#4c)および単純反応緩衝液(IZ)はネガティブコントロールとして役立った。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、FVII様活性についての、ハイブリドーマ細胞培養からの上清のスクリーニングの結果を示す。融合実験から予め選択されたクローン(193、195および196)を、色素形成アッセイで試験した。

【図2】

図2は、マスタープレート上のハイブリドーマ細胞培養における上清のIGG媒介FVII因子様活性についてのスクリーニングの結果を示す。

【図3】

図3は、クローン193/C0のサブクローニング、すなわち、一回目のクローニングの結果を示す。

【図4】

図4は、開始クローン193/C0由来のハイブリドーマ培養物の色素形成FVII様活性および第IX因子-ELisa反応性の比較を示す。

【図5】

図5は、いくつかのマスタークローンおよびサブクローンの色素形成活性の測定結果を示す。

【図6A】

図6Aは、ヒトFVII、TBS緩衝液および細胞培養培地と比較した、抗FX/FIXa抗体193/AD3および196/AF2のFVII様活性を示す。遅滞期の後に、両方の抗体は、増加する光学密度によって判断されるように、色素形成基質の切断を生じた。

【図6B】

図6Bは、第VII因子、196/AF1、198/AC1/1およびマウスIgGの色素形成活性の比較を示す。

【図7A】

図7Aは、第Xa因子特異的インヒビターの添加を伴った、または伴わない、第VII因子および196/AF2による第Xa因子の生成の速度論の比較を示す。

【図7B】

図7Bは、第Xa因子特異的インヒビターであるPefabloc Xa（登録商標）の添加を伴った、または伴わない、第VII因子、マウスIgG、および抗IX/Xa因子抗体198/AM1による第Xa因子の生成の速度論の比較を示す。

【図8A】

図8Aは、リン脂質、FIXa/FXおよびカルシウムイオンの存在下、および非存在下における、精製された抗IX/Xa因子抗体198/AC1/1の第VII因子様活性の依存性の測定を示す。

【図8B】

図8Bは、リン脂質、Ca<sup>2+</sup>およびFIXa/FXの存在下における、抗FIXa抗体196/AF1によるFXa生成の依存性の測定を示す。

【図8C】

図8Cは、非特異的マウスIgG抗体によるFXaの生成を示す。

【図9】

図9は、種々の濃度の抗IX/Xa因子抗体193/AD3を用いることによるAPTTアッセイにおける第VII因子欠乏血漿の凝固時間のグラフ表示である。

【図10A】

図10Aは、因子IXaの存在下において、抗体193/AD3が、第VII因子欠乏血漿の凝固時間を短縮することを示す。

【図10B】

図10Bは、第IXa因子インヒビターおよび第VII因子インヒビターの存在下における、抗体193/AD3による凝固時間の、用量依存性短縮を示す。

【図11】

図11は、ヒトFIXaβの存在下、および非存在下における、抗体198/A1、198/B1および198/AP1の色素形成活性を示す。

【図12】

図12は、マウス抗体の可変重鎖の遺伝子増幅のためのプライマー配列を示す。

【図13】

図13は、マウス抗体の可変軽(κ)鎖の遺伝子増幅のためのプライマー配列を示す。

【図14】

図14は、ハイブリドーマ細胞株193/AD3由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質の配列を示す(配列番号81および配列番号82)。

【図15】

図15は、ハイブリドーマ細胞株193/K2由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質配列を示す(配列番号83および配列番号84)。

【図16】

図16は、ハイブリドーマ細胞株198/AB2(198/B1のサブクローン)由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質配列を示す(配列番号85および配列番号86)。

【図17】

図17は、細胞株198/A1由来のscFvのDNAおよび推論されるタンパク質配列を示す(配列番号87および配列番号88)。

【図18】

図18は、2.9nMのヒトFIXaの存在下における、ペプチドA1/3の色素形成FVII活性を示す。ペプチドA1/3のスクランブルバージョンペプチドA1/5は、いずれのFIXa生成も起こさない。

【図19】

図19は、ヒトF I X aの存在に対する、ペプチドA1／3の色素形成F V I I I様活性の依存性を示す。ヒトF I X aの非存在下において、ペプチドA1／3は、いずれのF X aの生成も起こさない。緩衝液コントロールである単体のイミダゾール緩衝液は、I Zと表される。

【図20】

図20は、A r g残基のキラリティーが、ペプチドA1／3-r dおよびA1／3-r d-s r m bの色素形成活性に対して有意な役割を果たさないことを示す。

【図21】

図21は、反応混合物への2.4 μMのペプチドB1／7の添加が、F x aの測定可能な生成を引き起こしたことを示す。

【図22】

図22は、F X特異的インヒビターの添加が、反応に有意な減少を引き起こすことを示す。F I X aが全く存在せず、かつF Xが反応混合物に添加される場合、F X aは合成されなかった。

【図23】

図23は、ペクターp B a x-I g G Iを示す。

【図24】

図24は、抗体198／B1（図24A）およびI g M抗体198／A F 1（図24B）の存在下における、F I X aのアミド分解活性の増加を示す。

【図25】

図25は、2.3 nMのヒトF I X aの存在下における抗体198／A1 F a bフラグメントの色素形成F V I I I様活性を示す。ポジティブコントロールとして、インタクトな抗体198／A1および7.5 pMのF V I I Iを使用した。緩衝液コントロール（I Z）を、ネガティブコントロールとして用いた。

【図26】

図26は、198 A B 2 s c F v-アルカリホスファターゼ融合タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す（発現ペクターp D A P 2-19

8AB2#100のORF、(配列番号89および配列番号90)。抗体198/AB2(198/AB2は、198/B1の同一サブクローンである)のVLおよびVHドメインに対する遺伝子は、実施例10に記載されるように、対応するハイブリドーマ細胞に由来した。VH遺伝子のPCR産物は、消化SfiI-AscIであり、そしてVL遺伝子のPCR産物は消化AscIおよびNotIであった。VH遺伝子およびVL遺伝子は、AscI部位を介して結合し、SfiI-NotI消化ベクターpDAP2に挿入された(Kerschbaumer R. J. ら、Immunotechnology 2、145-150、1996; GeneBank 受託番号: U35316)。PelBリーダー: Erwinia carotovoraベクタートリアーゼBのリーダー配列、Hisタグ、金属イオンクロマトグラフィーのためのヒスチジン(Histidine)タグ。

【図27】

図27は、2.3 nMのヒトFIXaの存在下における、2つの抗体198/B1(サブクローンAB2) scFvフラグメントアルカリホスファターゼ融合タンパク質(198AB2#1および198AB2#100)の色素形成FVII活性を示す。ポジティブコントロールとして、7.5 pMのFVIIを使用した。

【図28】

図28は、pZip198AB2#102のアミノ酸およびヌクレオチド配列を示す(配列番号91および配列番号92)。

【図29】

図29は、mAB#8860 scFvアルカリホスファターゼ融合タンパク質(ベクターpDAP2-8860 scFv#11)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号93および94)。抗体#8860のVLドメインおよびVHドメインに対する遺伝子は、実施例10に記載されるように、対応するハイブリドーマ細胞から誘導された。VH遺伝子のPCR産物は、消化SfiI-AscIであり、そしてVL遺伝子のPCR産物は、消化AscIおよびNotIであった。VH遺伝子およびVL遺伝子は、AscI部位を介して結合し

、そしてSfiI-NotI消化ベクターpDAP2に挿入された(Kerschbaumer R. J. ら、Immunotechnology 2、145-150、1996; GeneBank 受託番号: U35316)。

【図30】

図30は、mAB#8860 scFv-ロイシンジッパー融合タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(ミニ抗体(miniantibody); ベクターp8860-Zip#1. 2 (配列番号95および配列番号96)。scFvフラグメントの遺伝子は、mAB#8860から誘導され、そしてベクターpDAP2-8860scFv#11からSfiI-NotI消化プラスミドpZip1へスワップされた(Kerschbaumer R. J. ら、Analytical Biochemistry 249、219-227、1997; GeneBank 受託番号: U94951)。

【図31】

図31は、2. 3 nMのヒトFIXaの存在下における、198/B1 (サブクローンAB2) ミニ抗体198AB-Zip#102のの色素形成FVII活性を示す。ポジティブコントロールとして、4. 8 pMのFVIIが用いられ、一方、ネガティブコントロールとして、無関係のミニ抗体(8860-Zip#1. 2) および単体反応緩衝液(IZ) が利用された。

【図32】

図32は、プラスミドpMycHis6の概略図を示す。

【図33】

図33は、ベクターpCOCKと異なるプラスミドpMycHis6の一部分のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号97および配列番号98)。ベクターpMycHis6は、NotIおよびEcoRIによって、ベクターpCOCK(Engelhardtら、1994、Biotechniques、17: 44-46)を切断し、そしてオリゴヌクレオチド: mychis6-co: 5' ggccgcagacacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatggcgcgccacatcaccatcaccatcactaataag3' (配列番号79) およびmycchis-ic: 5' a

a t t c t t a t t a g t g a t g g t g a t g g t g a t g t g c c g c c c  
c a t t c a g a t c c t c t t c t g a g a t g a g t t t t t g t t c t g  
c (配列番号80) を挿入することによって構築された。

【図34】

図34は、(c-myc-タグおよびHis6-タグに結合した) 198AB2 scFv: 発現ベクターpMycHis6-198AB2#102のORFのスクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。ベクターpMycHis6は、ベクターpCOCK (Engelhardt O. ら, BioTechniques 17, 44-46, 1994) をNotI-EcoRIで切断し、そして以下のアニーリングしたオリゴヌクレオチド: (5' -GGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCGGCACATCACCATCACCATCACTAATAAG-3' (配列番号103)、および5' -TTATTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCCGCCCATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTCTGTC-3' (配列番号104)) を挿入することによって構築された。その結果得られたベクター (pMycHis6と命名される) は、切断されたSfiI-NotIであり、そしてscFv198AB2の遺伝子は、このベクターへ、pDAP2-198AB2#100ベクターからスワップされた。

【図35】

図35は、c-myc-タグおよびHis6-タグに結合したmAB#8860 scFvのスクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す (ベクターp8860-M/H#4c、配列番号101および配列番号102)。プラスミドpMycHis6は、SfiIおよびNotIによって切断され、そしてscFv 8860#11タンパク質をコードするDNA配列は、pDAP2-8860 scFv#11 (図29を参照) から挿入され、プラスミドp8860-M/H#4を与えた。

【図36】

図36は、2.3nMのヒトFIXaの存在下における、198/B1 (サブクローンAB2) scFvフラグメント (MycHis-198AB2#102



）の色素形成F V I I I様活性を示す。ポジティブコントロールとして、4.8 pMのF V I I Iを使用し、一方、ネガティブコントロールとして、無関係の s c F v（8860-M/H#4c）および単体の反応緩衝液（I Z）が利用された。

【图1】

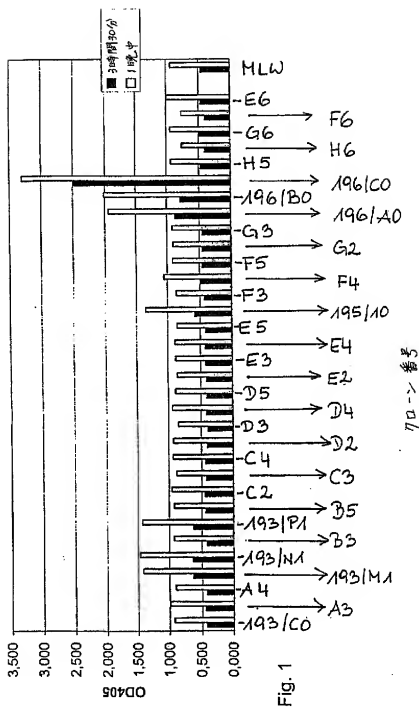


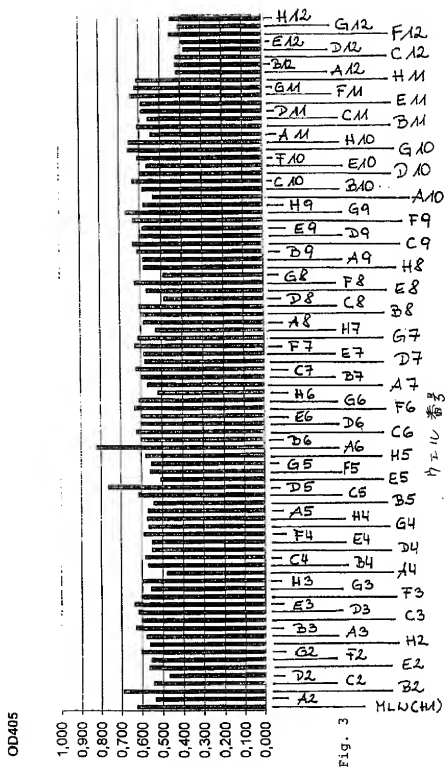
Fig. 1

【图2】

|  |      |            |      |
|--|------|------------|------|
|  | H 12 | G 12       | F 12 |
|  | E 12 | D 12       | C 12 |
|  | B 12 | A 12       | H 11 |
|  | G 11 | F 11       | E 11 |
|  | D 11 | C 11       | B 11 |
|  | A 11 | H 10       | G 10 |
|  | F 10 | E 10       | D 10 |
|  | C 10 | B 10       | A 10 |
|  | H 9  | G 9        | F 9  |
|  | E 9  | D 9        | C 9  |
|  | B 9  | A 9        | H 8  |
|  | G 8  | F 8        | E 8  |
|  | D 8  | C 8        | B 8  |
|  | A 8  | H 7        | G 7  |
|  | F 7  | E 7        | D 7  |
|  | C 7  | B 7        | A 7  |
|  | H 6  | G 6        | F 6  |
|  | E 6  | D 6        | C 6  |
|  | B 6  | A 6        | H 5  |
|  | G 5  | F 5        | E 5  |
|  | D 5  | C 5        | B 5  |
|  | A 5  | H 4        | G 4  |
|  | F 4  | E 4        | D 4  |
|  | C 4  | B 4        | A 4  |
|  | H 3  | G 3        | F 3  |
|  | E 3  | D 3        | C 3  |
|  | B 3  | A 3        | H 2  |
|  | G 2  | F 2        | E 2  |
|  | D 2  | C 2        | B 2  |
|  | A 2  | MLW (CH 1) |      |

OD405

【图3】



【图 4】

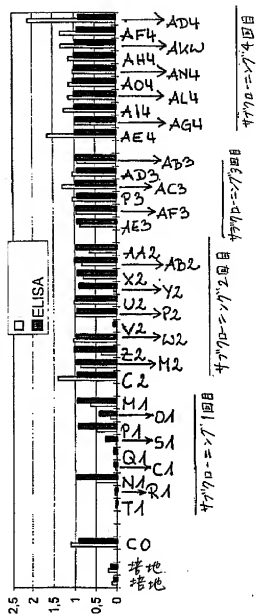


Fig. 4



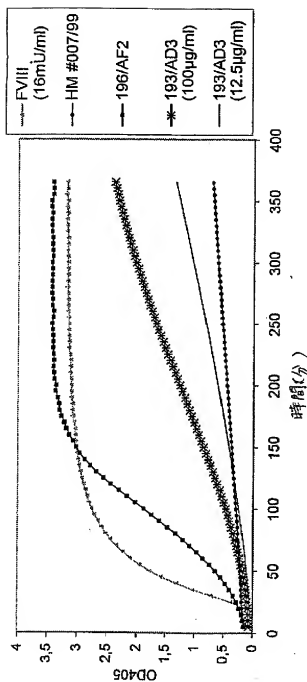


Fig. 6A

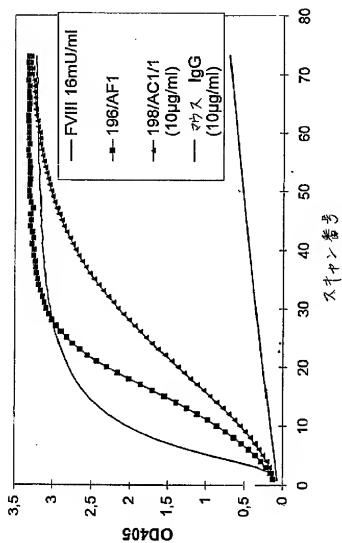


Fig. 6B



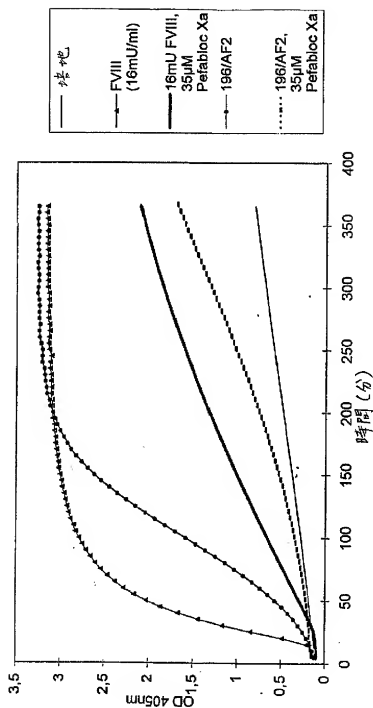


Fig. 7A

【图 7 B】

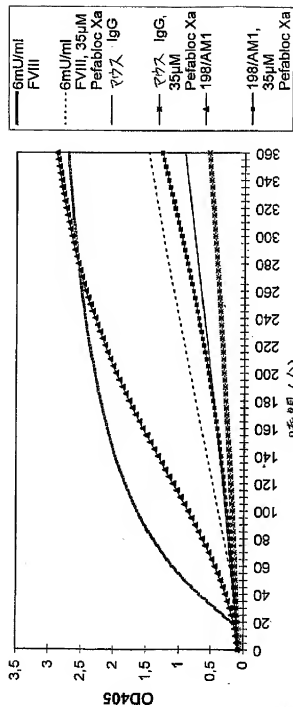


Fig. 7B

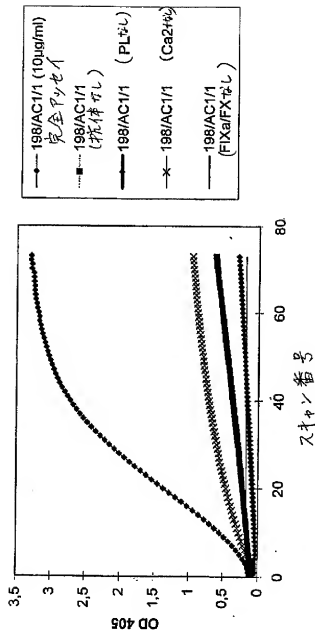


Fig. 8A

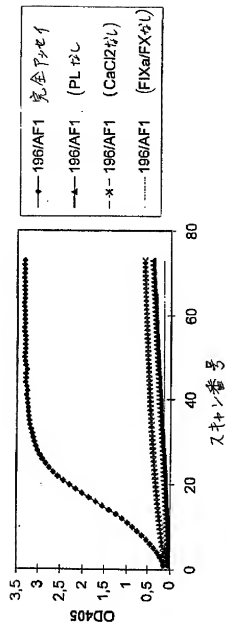


Fig. 8B

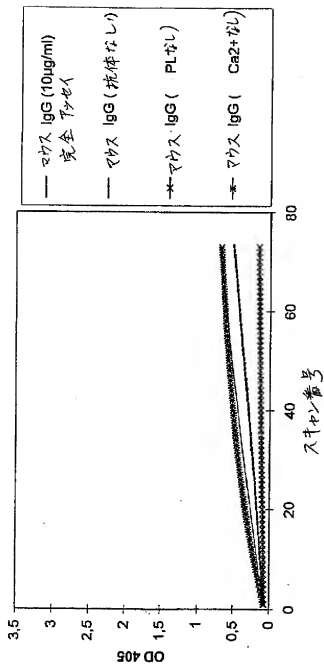


Fig. 8C

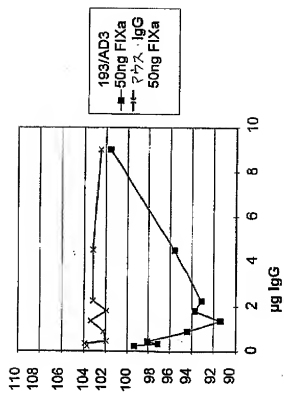


Fig.9

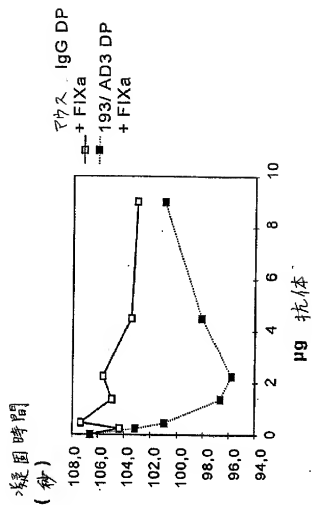


Fig. 10A

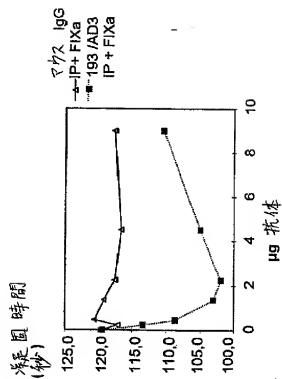


Fig. 10B



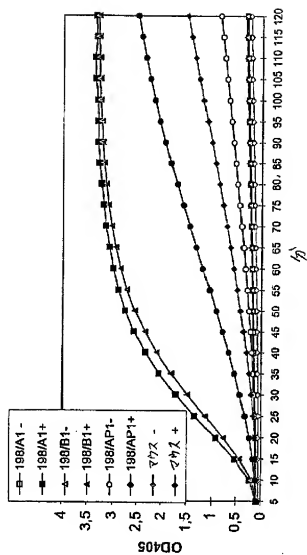


Fig.11

マウス  $V_H$  逆方向 プライマー ( *shii*-部位を含む ) :

|              |   |
|--------------|---|
| VH1BACK-shii | 5' C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTS MAR CTG CAG<br>SAG TCM GG 3' (SEQ.ID.NO. 50) |
| VH1BACKsf1   | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 51)   |
| VH2BACKsf1   | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 52)   |
| VH3BACKsf1   | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG AAG SAG TCA<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 53)   |
| VH4/6BACKsf1 | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 54)   |
| VH5/9BACKsf1 | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 55)   |
| VH7BACKsf1   | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 56)   |
| VH8BACKsf1   | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 57)   |
| VH10BACKsf1  | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAA GTG CAG CTG KTG GAG WCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 58)   |
| VH11BACKsf1  | 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG ATC CAG TTG CTG CAG TCT<br>GG 3' (SEQ.ID.NO. 59)   |

F15. 12-1

|                              |  |  |
|------------------------------|--|--|
| (図 12-2 のアウプ)                |  |  |
| デウス JH 順方向 プライマー             |  |  |
| ( 5' リンク - 配列が AscI-部位を含む ): |  |  |
| VH1FOR2LIAsc                 | 5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT |  |
|                              | GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC 3' (SEQ.ID.NO. 60)                      |  |
| JH1FORLIAsc                  | 5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT |  |
|                              | GAC CGT GGT CCC 3' (SEQ.ID.NO. 61)                                 |  |
| JH2FORLIAsc                  | 5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC TGT |  |
|                              | GAG AGT GGT GCC 3' (SEQ.ID.NO. 62)                                 |  |
| JH3FORLIAsc                  | 5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGC AGA GAC AGT |  |
|                              | GAC CAG AGT CCC 3' (SEQ.ID.NO. 63)                                 |  |
| JH4FORLIAsc                  | 5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT |  |
|                              | GAC TGA GGT TCC 3' (SEQ.ID.NO. 64)                                 |  |

IUPAC-Code: N=A/C, W=A/T, R=A/G, Y=C/T, S=C/G, K=G/T, H=A/C/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=T/C/G.

Fig. 12-2

アウス  $v_k$  逆方向プライマー

( AscI-部位 E10" に 9-bp-配列を含む ):

|                |  |
|----------------|--|
| VK2BACK-LiAscI | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG |
|                | CTC ACC CAG TCT CCA 3' (SEQ.ID.NO. 65)                         |
| VK1BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG |
|                | ATG WCA CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 66)                          |
| VK2BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT GTT KTG |
|                | ATG ACC CAA ACT CC 3' (SEQ.ID.NO. 67)                          |
| VK3BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATT GTG |
|                | ATR ACB CAG GOW GC 3' (SEQ.ID.NO. 68)                          |
| VK4BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG |
|                | CTG ACN CAR TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 69)                          |
| VK5BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG SAA AWT GTK |
|                | CTC ACC CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 70)                          |
| VK6BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAY ATY VMS |
|                | ATG ACM CAG MCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 71)                          |
| VK7BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CPA ATT GTT |
|                | CTC ACC CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 72)                          |
| VK8BACKLi Asc  | 5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCA TTA TTG |
|                | CAG GTG CTT GTG GG 3' (SEQ.ID.NO. 73)                          |

Fig. 13-1

(四) (3077) マウス  $J_K$  順方向プライマー (NotI-部位を含む):

|                 |   |
|-----------------|---|
| JK1NOT10        | 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CGG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC 3' |
| (SEQ.ID.NO. 74) |   |
| JK2NOT10        | 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CGG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC 3' |
| (SEQ.ID.NO. 75) |   |
| JK3NOT10        | 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CGG TTT TAT TTC CAG TCT GGT CCC 3' |
| (SEQ.ID.NO. 76) |   |
| JK4NOT10        | 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CGG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3' |
| (SEQ.ID.NO. 77) |   |
| JK5NOT10        | 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CGG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3' |
| (SEQ.ID.NO. 78) |   |

IUPAC-2-<sup>1</sup>: K=G/T, N=A/C, W=A/T, R=A/T, G=C/T, S=C/G, H=A/C/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=T/C/G.

Fig. 13-2

VH

+1 E V K L V E S G P E L K K P G

1 GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA

+1 E T V K I S C K A S G Y I F T

46 GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ATC TTC ACA

+1 N Y G M N W V K Q A P G K G L

91 AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA

+1 K W M G W I N T Y T G E P T Y

136 AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC ACT GGA GAG CCA ACA TAT

+1 A D D F K G R F A F S L E T S

181 GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT

+1 A S T A Y L Q I N N L K N E D

226 GCC AGC ACT GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC

+1 T A T Y F C A L Y G N S P K G

271 ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA TTA TAT GST AAC TCC CCT AAG GGG

+1 F A Y W G Q G T L V T V S A G

316 TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GGT

+1 G G G S G G R A S G G G S D

361 GGA GGC GGT TCA GGT GGG GGC GCT TCT GGC GGT GGC GGA TGG GAT

+1 I Q M T Q S P K F L L V S A G

406 ATT CAG ATG ACA CAG TCT CCC AAA TTC CTG CTT GTA TCA GCA GGA

Fig. 14-4

(Ⅷ) (497-73)

+1 D R V T I T C K A S Q S V S N  
451 GAC AGG GTT ACC ATA ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT CTG AGT BAT  
+1 D V A W Y Q Q K P G Q S P X L  
496 GAT GTA GCT TGG TAC CAA CAG AAG CCG GGG CAG TCT CCT AAA CTA  
+1 L M Y Y A S N R Y T G V F D R  
541 CTG ATG TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC  
+1 F T G S G Y G T D F T F T I S  
586 TTC ACT GGC AGT GGA TAT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC  
+1 T V Q A E D L A V Y F C Q Q D  
631 ACT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG GAT  
+1 Y G S P P T F G G G T K L E I  
676 TAT GGC TCT CCT CGC ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATT  
+1 K R  
721 AAA CGG

Fig. 14-2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| VH  | E   | V   | Q   | L   | V   | E   | S   | G   | G   | G   | L   | V   | K   | P   | G   |
| +1  | GNA | GTG | CAG | CTG | GTG | TCT | GGG | GGA | GGC | CTA | GTG | ANG | CCT | GGA |     |
| +1  | G   | S   | L   | K   | L   | S   | C   | A   | A   | S   | G   | F   | T   | F   | S   |
| 46  | GGG | TTC | CTG | ANA | CTC | TCC | TGT | GCA | GCC | TCT | GGA | TTC | ACT | TTC | AGT |
| +1  | T   | Y   | T   | H   | S   | W   | V   | R   | Q   | T   | P   | E   | K   | R   | L   |
| 91  | ACC | TAT | ACC | ATG | TCT | TGG | GTT | CGC | CAG | ACT | CCG | GAG | ANG | AGG | CTG |
| +1  | E   | W   | V   | A   | T   | I   | S   | S   | G   | G   | S   | Y   | T   | Y   | Y   |
| 136 | GAG | TGG | GTC | GCA | ACC | ATT | AGT | GGT | GGT | AGT | TAC | ACC | TAC | TAT |     |
| +1  | P   | D   | S   | V   | R   | G   | R   | F   | T   | I   | S   | R   | D   | N   | A   |
| 181 | CCA | GAC | AGT | GTG | AGG | GGC | GGA | TTC | ACC | ATC | TCC | AGA | GAC | AAT | GCC |
| +1  | K   | N   | T   | L   | Y   | L   | Q   | M   | S   | S   | L   | K   | S   | E   | D   |
| 226 | ANG | AMC | ACC | CTG | TAC | CTC | CNA | ATG | AGC | AGT | CTG | AGG | TCT | GAG | GAC |
| +1  | T   | A   | M   | Y   | Y   | C   | T   | R   | D   | G   | G   | H   | G   | Y   | G   |
| 271 | ACA | GCC | ATG | TAT | TAC | TGT | ACA | AGA | GAT | GGG | GGA | CAC | GGG | TAC | GGT |
| +1  | S   | S   | F   | D   | Y   | W   | G   | Q   | G   | T   | T   | L   | T   | V   | S   |
| 316 | AGT | AGC | TTT | GAC | TAC | TGG | GSC | CAA | GSC | ACC | ACT | CTC | ACA | GTC | TCC |
| +1  | S   | G   | G   | G   | G   | S   | G   | G   | R   | A   | S   | G   | G   | G   | G   |
| 361 | TCA | GGT | GGA | GGC | GGT | TCA | GGT | GGG | CGC | GCC | TCT | GGC | GGT | GGC | GGA |
| +1  | S   | Q   | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | L   | S   | L   | P   | V   | S   |
| 406 | TGG | CMA | ATT | GTG | CTC | ACC | CAG | TCT | CCA | CTC | TCC | CTG | CCT | GTC | AGT |

Fig. 15-1



( 四 ) (507777)

+1 L G D Q A S I S C R S S Q S I  
 451 CTT GGA GAT CAA GGC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT  
 +1 V H S N G N T Y L E W Y L O K  
 496 GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC CTG CAG AAA  
 +1 P G Q S P K L L I Y K V S N R  
 541 CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CIG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA  
 +1 F S G V P D K F S G S G S G T  
 586 TTT TCT GGG GTC CCA GAC AAA TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA  
 +1 D F T L K I S R V E A E D L G  
 631 GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA  
 +1 V Y Y C F Q G S H V P W T F G  
 676 GTT TAT TAC TGC TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCG TGG AGG TTC GGT  
 1 G G T K L E I K R  
 721 GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG

Fig. 15-2

+1 E V Q L O E S G G L V K P G  
 1 GAG GTG CAG CTT CMG GAG TCA GGG GCA GGC TTA GTG AAG CCT GGA  
  
 +1 G S L K L S C A A S G F T F S  
 46 GGG TCC CTG AHA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT  
  
 +1 S Y T M S W V R Q T P E K R L  
 91 AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CGG GAG AAG AGG CTG  
  
 +1 E W V A T I S S G S S T Y Y  
 136 GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT AGT TCC ACC TAC TAT  
  
 +1 P D S V K G R F T I S R D N A  
 181 CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC  
  
 +1 K N T L Y L Q M S S L R S E D  
 226 AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC  
  
 +1 T A M Y Y C T R E G G G F T V  
 271 ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA GAG GGG GGT TTT ACC GTC  
  
 +1 N W Y F D V W G A G T L V T V  
 316 AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACT CTG GTC ACT GTC  
  
 +1 S A G G G S G G R A S G G G  
 361 TCT GCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGG CGC GGC TCT GGC GGT GGC  
  
 VI  
 +1 G S E N V L T Q S P A S L A V  
 406 GGA TGG GAA AAT GTG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG  
  
 Fig. 16-4

(第 160773)

+1 S L G Q R A T I S C R A S E S  
 451 TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT  
 +1 V D S Y G Y N F M H W Y Q Q I  
 496 GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA  
 +1 P G Q P P K L L I Y R A S N L  
 541 CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA  
 +1 E S G I P A R F S G S G S R T  
 586 GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA  
 +1 D F T L T I N P V E A D D V A  
 631 GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA  
 +1 T Y Y C Q Q S N E D P L T F G  
 676 ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT  
 +1 T G T R L E I K R  
 721 ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA CGG

Fig. 16-2

VH

+1 E V Q L Q E S G G L V K P G G S L K L  
 1 GAG GTG CAG CTT CAG TCA GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGC TCC CTG AAA CTC  
 CTC CAC GTC GAA GTC CTC AGT CCC CCT CGG AAT CAC TTC GGA CTT CCC AGG GAC TTT GAG  
 +1 S C A A S G F I F S S Y T M S W V R Q T  
 61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ATT TTT AGT AGT TAT ACC ATG TCT TGG GTT GGC CAG ACT  
 AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TAA AAA TCA TCA ATA TGG TAC AGA ACC CAA GCG GTC TGA  
 +1 P E K R L E W V A T I S S G G S S T Y Y  
 121 CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT AGT TCC ACC TAC TAT  
 GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TGG TAA TCA TCA CCA TCA AGG TGG ATG ATA  
 +1 P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y  
 181 CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC  
 GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTG TTA CCG TTC TTG TGG GAC ATG  
 +1 L Q M S S L K S E D T A M Y H C T R E G  
 241 CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT CAC TGT ACA AGA GAG GGG  
 GAC GTT TAC TCG TCA GAC TTC AGA CTC CTG TGT CGG TAC ATA GTG ACA TGT TCT CTC CCC  
 +1 G G Y I V N W Y F D V W G A G T I L T V  
 301 GGT GGT TAT TAC GTC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA ACC ACT CTC ACA GTC  
 CCA CCA ATA ATG CAG TTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG CGT CCG TGG TGA GAG TGT CAG

||>φ-

VZ

+1 S S G G G S G G R A S G G G G S D I E  
 361 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGC GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG  
 AGG AGT CCA CTT CCG CCA AGT CCA CCC GCG CCG AGA CCG CCA CCG CTT AGC CTG TAA CTC  
 +1 L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C  
 421 CTC ACN CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT TCT CTA GGC CAG AGG CCG ACC ATA TCG TCG  
 GAG TGN GTC AGA GGT CGA AGA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CCG TGG TAT AGG AGG

Fig. 17-1

(1707777777)

+1 R A S E S V D S Y G K S F M H W Y Q Q K  
481 AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT TAT GGC AAG ACT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA  
TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG TTC TCA AAA TAC GTG ACC ATG GTC GTC TTT

+1 P G O P P K L L I Y R A S N L E S G I P  
541 CCA GGG CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GCG ATC CCT  
GGT CCC GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC TAG GGA

+1 A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E  
601 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CTT GTG GAG  
CGG TCC AAG TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG TGG TAA TTA GGA CAC CTC

+1 A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G  
661 GCT GAT GAT GTT GCN ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT CAC GAT CCC CTC ACG TTC GGT  
CGA CTA CTA CAA CGN TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA CTC GGG GAG TGC AAG CCA

+1 A G T R L E I K R  
721 GCT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA CGG  
CGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT GCC

Fig. 17-2

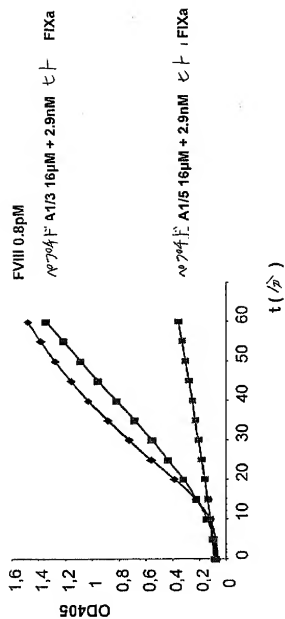


Fig. 18

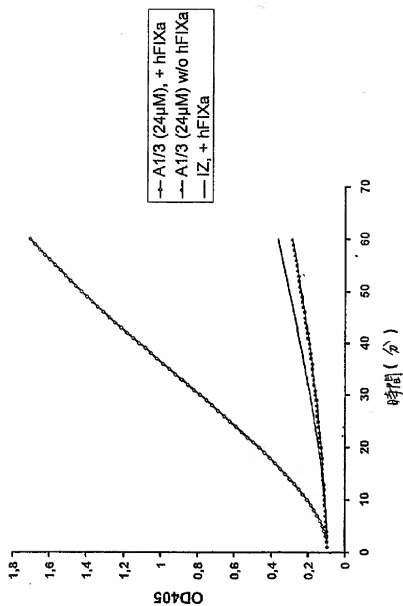


Fig. 19

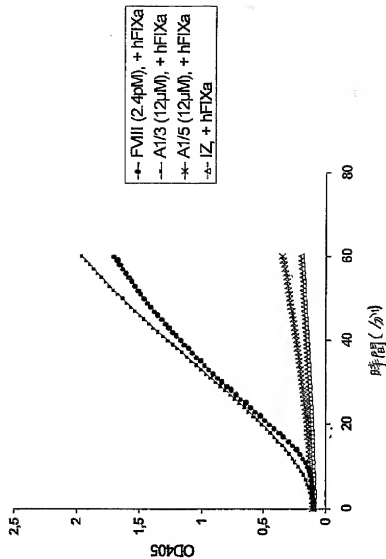


Fig. 20



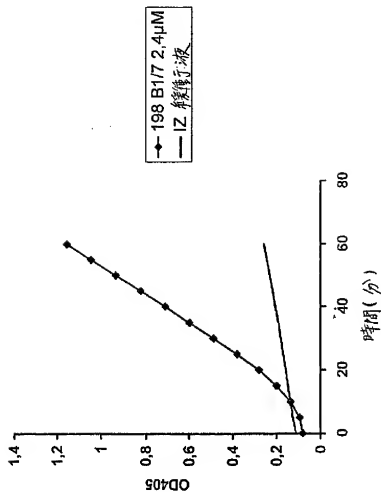


Fig. 21

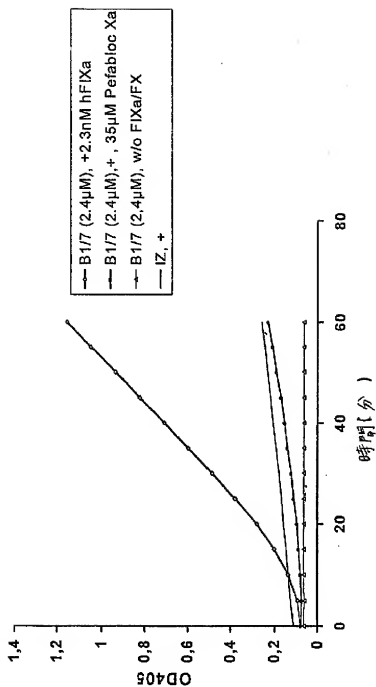


Fig. 22

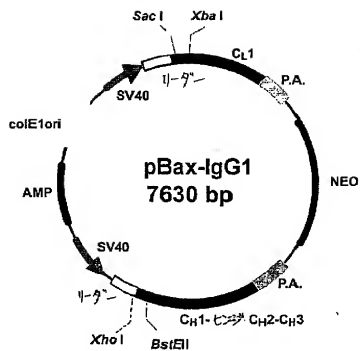


Figure 23

【图 2 4】

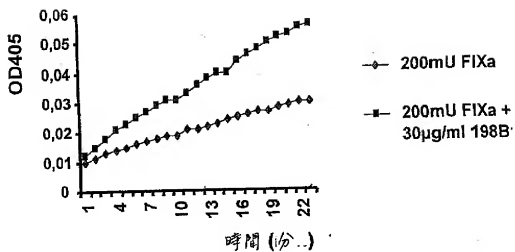


Fig. 24A

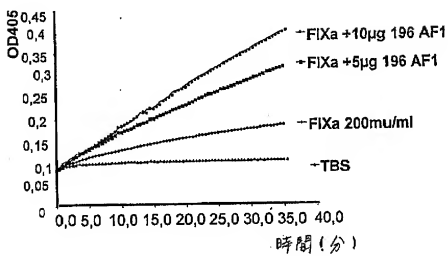


Fig. 24B

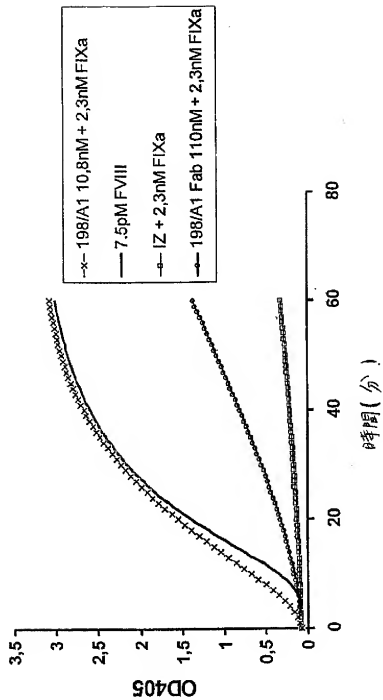


Fig. 25

|     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|     |     | PelB-1/-9 <sup>11</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | M   | K                       |     | L   | L   | P   | T   | A   | A   | A   | G   | L   | L   | L   |     |  |  |
| 1   | ATG | AAA                     | TAC | CTA | TTG | CCT | ACG | GCA | GCC | GCT | GGA | TTG | TTA | TTA |     |  |  |
|     | TAC | TTT                     | ATG | GAT | AAC | GGA | TGC | CGT | CGG | CGA | CCT | AAC | AAT | AAT |     |  |  |
|     |     | VH                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | L   | A                       | A   | Q   | P   | A   | M   | A   | E   | V   | K   | L   | V   | E   |     |  |  |
| 43  | CTC | GCG                     | GCC | CAG | CCG | GCC | ATG | GCG | GAG | GTG | AAG | CTG | GTG | GAG |     |  |  |
|     | GAG | GCG                     | CGG | GTC | GGC | CGG | TAC | CGC | CTC | CAC | TTC | GAC | CAC | CTC |     |  |  |
| +1  | S   | G                       | G   | G   | L   | V   | K   | P   | G   | G   | S   | L   | K   | L   |     |  |  |
| 85  | TCT | GGG                     | GGA | GGC | TTA | GTG | AAG | CCT | GGA | GGG | TCC | CTG | AAA | CTC |     |  |  |
|     | AGA | CCC                     | CCT | CCG | AAT | CAC | TTC | GGA | CCT | CCC | AGG | GAC | TTT | GAG |     |  |  |
| +1  | S   | C                       | A   | A   | S   | G   | F   | T   | F   | S   | S   | Y   | T   | M   |     |  |  |
| 127 | TCC | TGT                     | GCA | GCC | TCT | GGA | TTC | ACT | TTC | AGT | AGC | TAT | ACC | ATG |     |  |  |
|     | AGG | ACA                     | CGT | CGG | AGA | CCT | AAG | TGA | AAG | TCA | TCG | ATA | TGG | TAC |     |  |  |
| +1  | S   | W                       | V   | R   | Q   | T   | P   | E   | K   | R   | L   | E   | W   | V   |     |  |  |
| 169 | TCT | TGG                     | GTT | CGC | CAG | ACT | CCG | GAG | AAG | AGG | CTG | GAG | TGG | GTC |     |  |  |
|     | AGA | ACC                     | CRA | GCG | GTC | TGA | GGC | CTC | TTC | TCC | GAC | CTC | ACC | CAG |     |  |  |
| +1  | A   | T                       | I   | S   | S   | G   | G   | S   | S   | T   | Y   | Y   | P   | D   |     |  |  |
| 211 | GCA | ACC                     | ATT | AGT | AGT | GGN | GGT | AGT | TCC | ACC | TAC | TAT | CCA | GAC |     |  |  |
|     | CGT | TGG                     | TAA | TCA | TCA | CCN | CCA | TCA | AGG | TGG | ATG | ATA | GGT | CTG |     |  |  |
| +1  | S   | V                       | K   | G   | R   | F   | T   | I   | S   | R   | D   | N   | A   | K   |     |  |  |
| 253 | AGT | GTG                     | AAG | GGC | CGA | TTC | ACC | ATC | TCC | AGA | GAC | AAT | GCC | AAG |     |  |  |
|     | TCA | CAC                     | TTC | CCG | GCT | AAG | TGG | TAG | AGG | TCT | CTG | TTA | CGG | TTC |     |  |  |
| +1  | N   | T                       | L   | Y   | L   | Q   | M   | S   | S   | L   | R   | S   | E   | D   |     |  |  |
| 295 | AAC | ACC                     | CTG | TAC | CTG | CRA | ATG | AGC | AGT | CTG | AGG | TCT | GAG | GAC |     |  |  |
|     | TTG | TGG                     | GAC | ATG | GAC | GTT | TAC | TCG | TCA | GAG | TCC | ASA | CTC | CTG |     |  |  |
| +1  | T   | A                       | M   | Y   | Y   | C   | T   | R   | E   | G   | G   | G   | F   | T   |     |  |  |
| 337 | ACA | GCC                     | ATG | TAT | TAC | TGT | ACA | AGA | GAG | GGG | GGT | GGT | TTC | ACC |     |  |  |
|     | TGT | CGG                     | TAC | ATA | ATG | ACA | TGT | TCT | CTC | CCC | CCA | CCA | AAG | TGG |     |  |  |
| +1  | V   | N                       | W   | Y   | F   | D   | V   | W   | G   | A   | G   | T   | S   | V   |     |  |  |
| 379 | GTC | AAC                     | TGG | TAC | TTC | GAT | GTC | TGG | GGC | GCA | GGA | ACC | TCA | GTC |     |  |  |
|     | CAG | TTG                     | ACC | ATG | AAG | CTA | CAG | ACC | CCG | CGT | CCT | TGG | AGT | CAG |     |  |  |
|     |     | 11>b-                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | T   | V                       | S   | S   |     | G   | G   | G   | G   | S   | G   | G   | R   | A   | S   |  |  |
| 421 | ACC | GTC                     | TCC | TCA |     | GGT | SGA | GGC | GGT | TCA | GGT | GGG | CGC | GCC | TCT |  |  |
|     | TGG | CAG                     | CGG | AGT |     | CCA | CCT | CCG | CCA | AGT | CCA | CCC | GCG | CGG | AGA |  |  |

Fig. 26-1

(264773)

|     |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | VL  |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
|     | +1 | G   | G   | G   | G   | S   | D   | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | A   |  |  |  |  |  |
| 463 |    | GGC | GGT | GGC | GGA | TCG | SAC | ATT | GTG | CTG | ACA | CAG | TCT | CCA | GCT |  |  |  |  |  |
|     |    | CCG | CCA | CCG | CCT | AGC | CTG | TAA | CAC | GAC | TGT | GTG | AGA | GGT | CGA |  |  |  |  |  |
|     | +1 | S   | L   | A   | V   | S   | L   | G   | Q   | R   | A   | T   | I   | S   | C   |  |  |  |  |  |
| 505 |    | TCT | TTG | GCT | GTG | TCT | CTA | GGG | CAG | AGG | GCC | ACC | ATA | TCC | TGC |  |  |  |  |  |
|     |    | AGA | AAC | CGA | CAC | AGA | GAT | CCC | GTG | TCC | CGG | TGG | TAT | AGG | ACG |  |  |  |  |  |
|     | +1 | R   | A   | S   | E   | S   | V   | D   | S   | Y   | G   | Y   | N   | F   | M   |  |  |  |  |  |
| 547 |    | AGA | GCC | AGT | GAA | AGT | GTT | GAT | AGT | TAT | GGC | TAT | AAT | TTT | ATG |  |  |  |  |  |
|     |    | TCT | CGG | TCA | CTT | TCA | CAA | CTA | TCA | ATA | CCG | ATA | TTA | AAA | TAC |  |  |  |  |  |
|     | +1 | H   | W   | Y   | Q   | Q   | I   | P   | G   | Q   | P   | P   | K   | L   | L   |  |  |  |  |  |
| 589 |    | CAC | TGG | TAT | CAG | CAG | ATA | CCA | GGA | CAG | CCA | CCC | AAA | CTC | CTC |  |  |  |  |  |
|     |    | GTG | ACC | ATA | GTG | GTC | TAT | GGT | CCG | GTG | GGT | GGG | TTT | GAG | GAG |  |  |  |  |  |
|     | +1 | I   | Y   | R   | A   | S   | N   | L   | E   | S   | G   | I   | P   | A   | R   |  |  |  |  |  |
| 631 |    | ATC | TAT | CGT | GCA | TCC | AAC | CTA | GAG | TCT | GGG | ATC | CCT | GCC | AGG |  |  |  |  |  |
|     |    | TAG | ATA | GCA | CGT | AGG | TTG | GAT | CTC | AGA | CCC | TAG | GGA | CGG | TCC |  |  |  |  |  |
|     | +1 | F   | S   | G   | S   | G   | S   | R   | T   | D   | F   | T   | L   | T   | I   |  |  |  |  |  |
| 673 |    | TTC | AGT | GGC | AGT | GGG | TCT | AGG | ACA | GAC | TTC | ACC | CTC | ACC | ATT |  |  |  |  |  |
|     |    | AAG | TCA | CCG | TCA | CCC | AGA | TCC | TGT | CTG | AAG | TGG | GAG | TGG | TAA |  |  |  |  |  |
|     | +1 | N   | P   | V   | E   | A   | D   | D   | V   | A   | T   | Y   | Y   | C   | Q   |  |  |  |  |  |
| 715 |    | AAT | CCT | GTG | GAG | GCT | GAT | GAT | GTT | GCA | ACC | TAT | TAC | TGT | CAG |  |  |  |  |  |
|     |    | TTA | GGA | CAC | CTC | CGA | CTA | CTA | CAA | CGT | TGG | ATA | ATG | ACA | GTC |  |  |  |  |  |
|     | +1 | Q   | S   | N   | E   | D   | P   | L   | T   | F   | G   | T   | G   | T   | R   |  |  |  |  |  |
| 757 |    | CAA | AGT | AAT | GAG | GAT | CCG | CTC | ACG | TTC | GGT | ACT | GGG | ACC | AGA |  |  |  |  |  |
|     |    | GTT | TCA | TTA | CTC | CTA | GGC | GAG | TGC | AAG | CCA | TGA | CCC | TGG | TCT |  |  |  |  |  |
|     | +1 | L   | E   | I   | K   | R   | A   | A   | A   | A   | R   | A   | P   | E   | M   |  |  |  |  |  |
| 799 |    | CTG | GAA | ATA | AAA | CGG | CGG | GCC | GCA | GCC | CGG | GCA | CCA | GAA | ATG |  |  |  |  |  |
|     |    | GAC | CTT | TAT | TTT | GCC | CGC | CGG | CGT | CGG | GCC | CGT | GGT | CTT | TAC |  |  |  |  |  |
|     | +1 | P   | V   | L   | E   | N   | R   | A   | A   | Q   | G   | D   | I   | T   | A   |  |  |  |  |  |
| 841 |    | CCT | GTT | CTG | GAA | AAC | CGG | GCT | GCT | CAG | GGC | GAT | ATT | ACT | GCA |  |  |  |  |  |
|     |    | GGA | CAA | GAC | CTT | TTG | GCC | CGA | CGA | GTC | CCG | CTA | TAA | TGA | CGT |  |  |  |  |  |
|     | +1 | P   | G   | G   | A   | R   | R   | L   | T   | G   | D   | Q   | T   | A   | A   |  |  |  |  |  |
| 883 |    | CCC | GGC | GGT | GCT | CGC | CGT | TTA | ACG | GGT | GAT | CAG | ACT | GCC | GCT |  |  |  |  |  |
|     |    | GGG | CCG | CCA | CGA | CGG | GCA | AAT | TGC | CCA | CTA | GTC | TGA | CGG | CGA |  |  |  |  |  |
|     | +1 | L   | R   | D   | S   | L   | S   | D   | K   | P   | A   | K   | N   | I   | I   |  |  |  |  |  |
| 925 |    | CTG | CGT | GAT | TCT | CTT | AGC | GAT | AAA | CCT | GCA | AAA | AAT | ATT | ATT |  |  |  |  |  |
|     |    | GAC | GCA | CTA | AGA | GAA | TGC | CTA | TTT | GGA | CGT | TTT | TTA | TAA | TAA |  |  |  |  |  |

Fig. 26-2

(269773)

+1 L L I G D G M G D S E I T A  
967 TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC  
AAC GAC TAA CCG CTA CCC TAC CCC CTG AGC CTT TAA TGA CGG

+1 A R N Y A E G A G G F F K G  
1009 GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT  
CGT GCA TTA ATA CCG CTT CCA GCG CCG CCG AAA AAA TTT CCA

+1 I D A L P L T G Q Y T H Y A  
1051 ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG  
TAT CTA CGG AAT GGC GAA TGG CCC GTT ATG TGA GTG ATA CGC

+1 L N K K T G K P D Y V T D S  
1093 CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG  
GAC TTA TTT TTT TGG CCG TTT GGC CTG ATG CAG TGS CTG AGC

+1 A A S A T A W S T G V K T Y  
1135 GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT  
CGA CGT AGT CGT TGG CCG ACC AGT TGG CCA CAG TTT TGG ATA

+1 N G A L G V D I H E K D H P  
1177 AAC GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA  
TTG CCG CGC GAC CCG CAG CTA TAA GTG CTT TTT CTA GTG GGT

+1 T I L E M A K A A G L A T G  
1219 ACG ATT CTG GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT  
TGC TAA GAC CTT TAC CGT TTT CCG CGT CCA GAC CGC TGG CCA

+1 N V S T A E L Q D A T P A A  
1261 AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG  
TTG CAA AGA TGG CGT CTC AAC GTC CTA CGG TGC GGG CGA CGC

+1 L V A H V T S R K C Y G P S  
1303 CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC  
GAC CAC CGT GTA CAC TGG AGC GCG TTT ACG ATG CCA GGC TCG

+1 A T S E K C P G N A L E K G  
1345 GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC  
CGC TGG TCA CTT TTT ACA GGC CCA TTG CGA GAC CTT TTT CCG

+1 G K G S I T E Q L L N A R A  
1397 GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC  
CCT TTT CCT AGC TAA TGG CTT GTC GAC GAA TTG CGA GCA CGG

+1 D V T L G G G A K T F A E T  
1429 GAC GTT ACG CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG  
CTG CAA TGC GAA CCG CCG CCG CGT TTT TGG AAA CGA CTT TGC

Fig. 26-3



(图 26-4-1)

```

+1  A  T  A  G  E  W  Q  G  K  T  L  R  E  Q
1471 GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG
    CGT TGG CGA CCA CTT ACC GTC CCT TTT TGC GAC GCA CTT GTC

+1  A  Q  A  R  G  Y  Q  L  V  S  D  A  A  S
1513 GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA
    CGT GTC CGC GCA CCA ATA GTC AAC CAC TCG CTA CGA CSG AGT

+2  L  N  S  V  T  E  A  N  Q  Q  K  P  L  L
1555 CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT
    GAC TTA AGC CAC TGC CTT CGC TTA GTC GTT TTT GGG GAC GAA

+1  G  L  F  A  D  G  N  M  P  V  R  W  L  G
1597 GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA
    CCG GAC AAA CGA CTG CCG TTA TAC GGT CAC GCG ACC GAT CCT

+1  P  K  A  T  Y  H  G  N  I  D  K  P  A  V
1639 CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC
    GGC TTT CGT TGC ATG GTA CCG TTA TAG CTA TTC GGG CGT CAG

+1  T  C  T  P  N  P  Q  R  N  D  S  V  P  T
1681 ACC TGT ACG CCA AAT CCG GAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC
    TGG ACA TGC GGT TTA GGC GTT GCA TTA CTG TCA CAT GGT TGG

+1  L  A  Q  M  T  D  K  A  I  E  L  L  S  K
1723 CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA
    GAC GCG GTC TAC TGG CTG TTT CGG TAA CTT AAC AAC TCA TTT

+1  N  E  K  G  F  F  L  Q  V  E  G  A  S  I
1765 AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC
    TTA CTC TTT CCG AAA AAG GAC GTT CAA CTT CCA GCG AGT TAG

+1  D  K  Q  D  H  A  A  N  P  C  G  Q  I  G
1807 GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC
    CTA TTT GTC CTA GTA CGA GCG TTA GGA ACA CCC GTT TAA CCG

+1  E  T  V  D  L  D  E  A  V  Q  R  A  L  E
1849 GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA
    CTC TGC CAG CTA GAG CTA CTT CGG CAT GTT GCC GCG GAC CTT

+1  F  A  K  K  E  G  N  T  L  V  I  V  T  A
1891 TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT
    AAG CGA TTT TTC CTC CCA TTG TGC GAC CAG TAT CAG TGG CGA

+1  D  H  A  H  A  S  Q  I  V  A  P  D  T  K
1933 GAT CAC GCC CAC GCC ACG CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAG
    CTA GTG CCG GTG CCG TCG GTC TAA CAA GCG GGC CTA TGG TTT

+1  A  P  G  L  T  Q  A  L  N  T  K  D  G  A
1975 GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA
    CGA GGC CCG GAG TGG GTC GCG GAT TTA TGG TTT CTA CCG CGT

```

Fig. 26-4

(図 26-7-2)

```

+1 V M V M S Y G N S E E D S Q
2017 GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA
      CAC TAC CAC TAC TCA ATG CCC TTG AGG CTT CTC CTA AGT GTT

+1 E H T G S Q L R I A A Y G P
2059 GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG
      CTT GTA TGG CCG TCA GTC AAC GCA TAA CGC GCG ATA CCG GGC

+P H A A N V V G L T D Q T D L
2101 CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC
      GTA CGG CGG TTA CAA CAA CTT GAC TGG CTG GTC TGG CTA GAG

+1 F Y T M K A A L G D I His tag
2143 TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG GAT ATC GCA CAC CAT
      AAG ATG TGG TAC TTT CGG CGA GAC CCC CTA TAG CGT GTG GTA

+1 H H H H *
2185 CAC CAT CAC CAT TAA
      GTG GTA GTG GTA ATT
  
```

Fig. 26-5

【图 27】

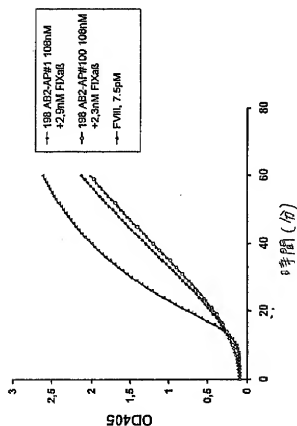


Fig. 27

PelB-4-9<sup>11</sup>  
 +1 M K Y L L P T A A A G L L L L  
 1 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC  
 TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT GAG  
 ,  
 VH  
 +1 A A Q P A M A E V K L V E S G  
 46 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG  
 CCG CCG GTC GGC CGG TAC GCG CTC CAC TTC GAC CAC CTC AGA CCC  
 +1 G G L V K P G G S L K L S C A  
 91 GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA  
 CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG AGG ACA CGT  
 +1 A S G F T F S S Y T M S W V R  
 136 GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC  
 CCG AGA CCT AAG TGA AAG TCA TCG ATA TGG TAC AGA ACC CAA GCG  
 +1 Q T P E K R L E W V A T I S S  
 181 CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT  
 GTC TGA GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TGG TAA TCA TCA  
 +1 G G S S T Y Y P D S V K G R F  
 226 GGN GGT AGT TCC ACC TAC TAT OCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC  
 CCN CCA TCA AGG TGG ATG ATA GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG  
 +1 T I S R D N A K N T L Y L Q M  
 271 ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CRA ATG  
 TGG TAG AGG TCT CTG TTA CCG TTC TTG TGG GAC ATG GAC GTT TAC  
 +1 S S L R S E D T A M Y Y C T R  
 316 AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA  
 TCG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGT CCG TAC ATA ATG ACA TGT TCT  
 +1 E G G G F T V N W Y F D V W S  
 361 GAG GGG GGT GGT TTC ACC GTC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC  
 CTC CCC CCA CCA AAG TGG CAG TTG ACC ATT AAG CTA CAG ACC CCG  
 4-9<sup>12</sup>  
 +1 A G T S V T V S S G G G S G  
 406 GCA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT  
 CGT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT CCA CCT CCG CCA AGT CCA  
 VL  
 +1 G R A S G G G G S D I V L T Q  
 451 GGG GCG GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACA CAG  
 CCC CCG CCG AGA CCG CCA CCG CCT AGC CTG TAA CAC GAC TGT GTC

Fig. 28-1

(図 28-1773)

```

+1 X P A S L A V S L G Q R A T I
496 TAT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA
ANA GGT CGA AGA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CGG TGG TAT

+1 S C R A S E S V D S Y G Y N F
541 TCN TGC AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT
AGN ACG TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG ATA TTA AAA

+1 M H W Y Q Q I P G Q P P K L L
586 ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC
TAC GTG ACC ATA GTC GTC TAT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG

+1 I Y R A S N L E S G I P A R F
631 ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC
TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTC AGA CCC TAG GGA CGG TCC AAG

+1 S G S G S R T D F T L T I N P
676 AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT
TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG GAG TGG TAA TTA GGA

+1 V E A D D V A T Y Y C Q Q S N
721 GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT
CAC CTC CGA CTA CTA CAA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA

+1 E D P L T F G T G T R L E I K
766 GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA
CTC CTA GGC GAG TGC AAG CCA TGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT

スパーサー          センジ          ヘリックス

+1 R A A A P K P S T P P G S S R
811 CGG GCG GCC GCA CCG AAG CCT TCC ACT CCG CCC GGG TCT TCC CGT
GCC CCG CGG CGT GGC TTC GGA AGG TGA GGC GGG CCC AGA AGG GCA

+1 K K Q L E D K V E E L L S K N
856 ATG AAA CAG CTG GAA GAC AAA GTA GAG GAG CTC CTT AGC AAG AAC
TAC TTT GTC GAC CTT CTG TTT CAT CTC CTC GAG GAA TCG TTC TTG

+1 Y H L E N E V A R L K K L V G
901 TAC CAT CTA GAA AAC GAG GTA GCT CGT CTG AAA AAG CTT GTT GGT
ATG GTA GAT CTT TTG CTC CAT CGA GCA GAC TTT TTC GAA CAA CCA

His-β34
+1 E R G G H H H H H *
946 GAA CGT GGT GGT CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA
CTT GCA CCA CCA GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT

```

Fig. 28-2

|     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|     |     | PalB- 11-9 <sup>h</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| +1  | M   | K                       | Y   | L   | L   | P   | T   | A   | A   | A   | G   | L   | L   | L   |  |  |  |
| 1   | ATG | AAA                     | TAC | CTA | TTG | CCT | ACG | GCA | GCC | GCT | GGA | TTG | TTA | TTA |  |  |  |
|     | TAC | TTT                     | ATG | GAT | AAC | GGA | TGC | CGT | CGG | CGA | CCT | AAC | AAT | AAT |  |  |  |
|     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     | VH  |     |     |     |     |  |  |  |
| +1  | L   | A                       | A   | Q   | P   | A   | M   | A   | E   | V   | Q   | L   | Q   | Q   |  |  |  |
| 43  | CTC | GCG                     | GCC | CAG | CCG | GCC | ATG | GCC | GAG | GTT | CAG | CTT | CAG | CAG |  |  |  |
|     | GAG | CGC                     | CGG | GTC | GGC | CGG | TAC | CGG | CTC | CAA | GTC | GAA | GTC | GTC |  |  |  |
| +1  | S   | G                       | P   | E   | L   | V   | K   | P   | G   | A   | S   | V   | K   | I   |  |  |  |
| 85  | TCT | GGA                     | CCT | GAG | CTG | GTG | AAG | CCC | GGG | GCC | TCA | GTG | AAG | ATT |  |  |  |
|     | AGA | CCT                     | GGA | CTC | GAC | CAC | TTC | GGG | CCC | CGG | AGT | CAC | TTC | TAA |  |  |  |
| +1  | S   | C                       | K   | A   | S   | G   | Y   | A   | F   | S   | S   | S   | W   | M   |  |  |  |
| 127 | TCC | TGC                     | AAA | GCT | TCT | GGC | TAC | GCA | TTC | AGT | AGC | TCT | TGG | ATG |  |  |  |
|     | AGG | ACG                     | TTT | CGA | AGA | CCG | ATG | CGT | AAG | TCA | TCG | AGA | ACC | TAC |  |  |  |
| +1  | N   | W                       | V   | K   | Q   | R   | P   | G   | Q   | G   | L   | E   | W   | I   |  |  |  |
| 169 | AAC | TGG                     | GTG | AAG | CAG | AGG | CCT | GGA | CAG | GGT | CTT | GAG | TGG | ATT |  |  |  |
|     | TTG | ACC                     | CAC | TTC | GTC | TCC | GGA | CCT | GTC | CCA | GAA | CTC | ACC | TAA |  |  |  |
| +1  | G   | R                       | I   | Y   | P   | G   | N   | G   | D   | T   | N   | Y   | N   | G   |  |  |  |
| 211 | GGA | CGG                     | ATT | TAT | CCT | GGA | AAT | GGA | GAT | ACT | AAC | TAC | AAT | GGG |  |  |  |
|     | CCT | GCC                     | TAA | ATA | GGA | CCT | TTA | CCT | CTA | TGA | TTG | ATG | TTA | CCC |  |  |  |
| +1  | K   | F                       | K   | G   | K   | A   | T   | L   | T   | A   | D   | K   | S   | S   |  |  |  |
| 253 | AAG | TTC                     | AAG | GGC | AAG | GCC | ACA | CTG | ACT | GCA | GAC | AAA | TCC | TCC |  |  |  |
|     | TTT | AAG                     | TTC | CCG | TTC | CGG | TGT | GAC | TGA | CGT | CTG | TTT | AGG | AGG |  |  |  |
| +1  | S   | T                       | A   | Y   | M   | Q   | L   | S   | S   | L   | T   | S   | V   | D   |  |  |  |
| 295 | AGC | ACA                     | GCC | TAC | ATG | CAG | CTC | AGC | AGC | CTG | ACC | TCT | GTG | GAC |  |  |  |
|     | TCG | TGT                     | CGG | ATG | TAC | GTC | GAG | TCG | TCG | GAC | TGG | AGA | CAC | CTG |  |  |  |
| +1  | S   | A                       | V   | Y   | F   | C   | A   | D   | G   | N   | V   | Y   | Y   | Y   |  |  |  |
| 337 | TCT | GCG                     | GTC | TAT | TTC | TGT | GCA | GAT | GGT | AAC | GTA | TAT | TAC | TAT |  |  |  |
|     | AGA | CGC                     | CAG | ATA | AAG | ACA | CGT | CTA | CCA | TTG | CAT | ATA | ATG | ATA |  |  |  |
| +1  | A   | M                       | D   | Y   | W   | G   | Q   | G   | T   | S   | V   | T   | V   | S   |  |  |  |
| 379 | GCT | ATG                     | GAC | TAC | TGG | GGT | CAA | GGA | ACC | TCA | GTC | ACC | GTC | TCC |  |  |  |
|     | CGA | TAC                     | CTG | ATG | ACC | CCA | GTT | CCT | TGG | AGT | CAG | TGG | CAG | AGG |  |  |  |
|     |     | 11-10 <sup>h</sup>      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| +1  | S   | G                       | G   | G   | G   | S   | G   | G   | R   | A   | S   | G   | G   | G   |  |  |  |
| 421 | TCA | GGT                     | GGA | GGC | GGT | TCA | GGT | GGG | CGC | GCC | TCT | GSC | GST | GGC |  |  |  |
|     | AGT | CCA                     | CCT | CCG | CCA | AGT | CCA | CCC | GCG | CGG | AGA | CCG | CCA | CCG |  |  |  |
|     |     | VL                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| +1  | G   | S                       | Q   | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | A   | S   | L   | A   |  |  |  |
| 463 | GGA | TCG                     | CAA | ATT | GTT | CTC | ACC | CAG | TCT | CCT | GCT | TCC | TTA | GCT |  |  |  |
|     | CCT | AGC                     | GTT | TAA | CAA | GAG | TGG | GTC | AGA | GGA | CGA | AGG | AAT | CGA |  |  |  |

Fig. 29-1

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| (29-2) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| +1     | V   | S   | L   | G   | Q   | R   | A   | T   | I   | S   | C   | R   | A   | S   |  |
| 505    | GTA | TCT | CTG | GGG | CAG | AGG | GCC | ACC | ATC | TCA | TGC | AGG | GCC | AGC |  |
|        | CAT | AGA | GAC | CCC | GTC | TCC | CGG | TGG | TAG | AGT | ACG | TCC | CGG | TGC |  |
| +1     | K   | S   | V   | S   | T   | S   | G   | Y   | S   | Y   | M   | H   | W   | Y   |  |
| 547    | AAA | AGT | GTC | AGT | ACA | TCT | GGC | TAT | AGT | TAT | ATG | CAC | TGG | TAC |  |
|        | TTT | TCA | CAG | TCA | TGT | AGA | CCG | ATA | TCA | ATA | TAC | GTG | ACC | ATG |  |
| +1     | Q   | Q   | K   | P   | G   | Q   | P   | P   | K   | L   | L   | I   | Y   | L   |  |
| 589    | CAA | CAG | AAA | CCA | GGA | CAG | CCA | CCC | AAA | CTC | CTC | ATC | TAT | CTT |  |
|        | GTT | GTC | TTT | GGT | CCT | GTC | GGT | GGG | TTT | GAG | GAG | TAG | ATA | GAA |  |
| +1     | A   | S   | N   | L   | E   | S   | G   | V   | P   | A   | R   | F   | S   | G   |  |
| 631    | GCA | TCC | AAC | CTA | GAA | TCT | GGG | GTC | CCT | GCC | AGG | TTC | AGT | GGC |  |
|        | CGT | AGG | TTG | GAT | CTT | AGA | CCC | CAG | GGA | CGG | TCC | AAG | TCA | CCG |  |
| +1     | S   | G   | S   | G   | T   | D   | F   | T   | L   | N   | I   | H   | P   | V   |  |
| 673    | AGT | GGG | TCT | GGG | ACA | GAC | TTC | ACC | CTC | AAC | ATC | CAT | CCT | GTG |  |
|        | TCA | CCC | AGA | CCC | TGT | CTG | AAG | TGG | GAG | TTG | TAG | GTA | GGA | CAC |  |
| +1     | E   | E   | E   | D   | A   | A   | T   | Y   | Y   | C   | Q   | H   | S   | R   |  |
| 715    | GAG | GAG | GAG | GAT | GCT | GCA | ACC | TAT | TAC | TGT | CAG | CAC | AGT | AGG |  |
|        | CTC | CTC | CTC | CTA | CGA | CGT | TGG | ATA | ATG | ACA | GTG | GTG | TCA | TCC |  |
| +1     | E   | L   | P   | R   | T   | F   | G   | G   | G   | T   | K   | L   | E   | I   |  |
| 757    | GAG | CTT | CCT | CGG | ACG | TTC | GGT | GGA | GGC | ACC | AAG | CTG | GAA | ATC |  |
|        | CTC | GAA | GGA | GCC | TGC | AAG | CCA | CCT | CCG | TGG | TTC | GAC | CTT | TAG |  |
| 29-2   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| +1     | K   | R   | A   | A   | A   | A   | R   | A   | P   | E   | M   | P   | V   | L   |  |
| 799    | AAA | CGG | GCG | GCC | GCA | GCC | CGG | GCA | CCA | GAA | ATG | CCT | GTT | CTG |  |
|        | TTT | GCC | CGC | CGG | CGT | CGG | GCC | CGT | GGT | CTT | TAC | GGA | CAA | GAC |  |
| +1     | E   | N   | R   | A   | A   | Q   | G   | D   | I   | T   | A   | P   | G   | G   |  |
| 841    | GAA | AAC | CGG | GCT | GCT | CAG | GGC | GAT | ATT | ACT | GCA | CCC | GGC | GGT |  |
|        | CTT | TTG | GCC | CGA | CGA | GTC | CCG | CTA | TAA | TGA | CGT | GGG | CCG | CCA |  |
| +1     | A   | R   | R   | L   | T   | G   | D   | Q   | T   | A   | A   | L   | R   | D   |  |
| 883    | GCT | CGC | CGT | TTA | ACG | GGT | GAT | CAG | ACT | GCC | GCT | CTG | CGT | GAT |  |
|        | CGA | GCG | GCA | AAT | TGC | CCA | CTA | GTC | TGA | CGG | CGA | GAC | GCA | CTA |  |
| +1     | S   | L   | S   | D   | K   | P   | A   | K   | N   | I   | I   | L   | L   | I   |  |
| 925    | TCT | CTT | AGC | GAT | AAA | CCT | GCA | AAA | AAT | ATT | ATT | TTG | CTG | ATT |  |
|        | AGA | GAA | TGC | CTA | TTT | GGA | CGT | TTT | TTA | TAA | TAA | AAC | GAC | TAA |  |
| 29-2   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| +1     | G   | D   | G   | M   | G   | D   | S   | E   | I   | T   | A   | A   | R   | N   |  |
| 967    | GGC | GAT | GGG | ATG | GGG | GAC | TGG | GAA | ATT | ACT | GCC | GCA | CGT | AAT |  |
|        | CCG | CTA | CCC | TAC | CCC | CTG | AGC | CTT | TAA | TGA | CGG | CGT | GCA | TTA |  |

Fig. 29-2

(図29のつぎ)

```

+1 Y A E G A G G F F K G I D A
1009 TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GST ATA GAT GCC
    ATA CGG CTT CCA CGC CCG CCG AAA AAA TTT CCA TAT CTA CGG

+1 L P L T G Q Y T H Y A L N K
1051 TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA
    AAT GGC GAA TGG CCC GTT ATG TGA GTG ATA CGC GAC TTA TTT

+1 K T G K P D Y V T D S A A S
1093 AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA
    TTT TGG CCG TTT GGC CTG ATG CAG TGG CTG AGC CGA CGT AGT

+1 A T A W S T G V K T Y N G A
1135 GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG
    CGT TGG CCG ACC AGT TGG CCA CAG TTT TGG ATA TTG CCG CGC

+1 L G V D I H E K D H P T I L
1177 CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG
    GAC CCG CAG CTA TAA GTG CTT TTT CTA GTG GGT TGC TAA GAC

+1 E M A K A A G L A T G N V S
1219 GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT
    CTT TAC CGT TTT CGG CGT CCA GAC CGC TGG CCA TTG CAA AGA

+1 T A E L Q D A T P A A L V A
1261 ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA
    TGG CGT CTC AAC GTC CTA CGG TGC GGG CGA CGC GAC CAC CGT

+1 H V T S R K C Y G P S A T S
1303 CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT
    GTA CAC TGG AGC GCG TTT ACG ATG CCA GGC TCG CGC TGG TCA

+1 E K C P G N A L E K G G K G
1345 GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA
    CTT TTT ACA GGC CCA TTG CGA GAC CTT TTT CCG CCT TTT CGT

+1 S I T E Q L L N A R A D V T
1387 TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG
    AGC TAA TGG CTT GTC GAC GAA TTG CGA GCA CGG CTG CAA TGC

+1 L G G G A K T F A E T A T A
1429 CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG GCA ACC GCT
    GAA CCG CCG CCG CGT TTT TGG AAA CGA CTT TGC CGT TGG CGA

+1 G E W Q G K T L R E Q A Q A
1471 GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA CAG GCG
    CCA CTT ACC GTC CCT TTT TGC GAC GCA CTT GTC CGT GTC CGC

```

Fig. 29-3

(图 29-4 773)

```

+1 R G Y Q L V S D A A S L N S
1513 CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG
      GCA CCA ATA GTC AAC CAC TCG CTA CGA CGG AGT GAC TTA AGC

+1 V T E A N Q Q K P L L G L F
1555, GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT
      CAC TGC CTT CGC TTA GTC GTT TTT GGG GAC GAA CCG GAC AAA

+1 A D G N M P V R W L G P K A
1597 GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA
      CGA CTG CCG TTA TAC GGT CAC GCG ACC GAT CCT GGC TTT CGT

+1 T Y H G N I D K P A V T C T
1639 ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG
      TGC ATG GTA CCG TTA TAG CTA TTC GGG CGT CAG TGG ACA TGC

+1 P N P Q R N D S V P T L A Q
1681 CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG
      GGT TTA GGC GTT GCA TTA CTG TCA CAT GGT TGG GAC CGC GTC

+1 M T D K A I E L L S K N E K
1723 ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA
      TAC TGG CTG TTT CGG TAA CTT AAC AAC TCA TTT TTA CTC TTT

+1 G F F L Q V E G A S I D K Q
1765 GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC GAT AAA CAG
      CCG AAA AAG GAC GTT CAA CTT CCA CGC AGT TAG CTA TTT GTC

+1 D H A A N P C G Q I G E T V
1807 GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC
      CTA GTA CGA CGC TTA GGA ACA CCC GTT TAA CCG CTC TGC CAG

+1 D L D E A V Q R A L E F A K
1849 GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA
      CTA GAG CTA CTT CGG CAT GTT GCC CGC GAC CTT AAG CGA TTT

+1 K E G N T L V I V T A D H A
1891 AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC
      TTC CTC CCA TTG TGC GAC CAG TAT CAG TGG CGA CTA GTG CGG

+1 H A S Q I V A P D T K A P G
1933 CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC
      GTG CGG TCG GTC TAA CAA CGC GGC CTA TGG TTT CGA GGC CGG

+1 L T Q A L N T K D G A V M V
1975 CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG
      GAG TGG GTC CGC GAT TTA TGG TTT CTA CCG CGT CAC TAC CAC

```

Fig. 29-4



(図 29-5a) (ア)

```

+1  M  S  Y  G  N  S  E  E  D  S  Q  E  H  T
2017  ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC
      TAC TCA ATG CCC TTG AGG CTT CTC CTA AGT GTT CTT GTA TGG

+1  G  S  Q  L  R  I  A  A  Y  G  P  H  A  A
2059  GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC
      CCG TCA GTC AAC GCA TAA CGC CGC ATA CCG GGC GTA CGG CGG

+1  N  V  V  G  L  T  D  Q  T  D  L  F  Y  T
2101  AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC
      TTA CAA CAA CCT GAC TGG CTG GTC TGG CTA GAG AAG ATG TGG

+1  M  K  A  A  L  G  D  I  A  H  H  H  H  H
2143  ATG AAA GCC GCT CTG GGG GAT ATC GCA CAC CAT CAC CAT CAC
      TAC TTT CGG CGA GAC CCC CTA TAG CGT TGT GTA GTG GTA GTG

+1  H  *
2185  CAT TAA
      GTA ATT

```

Fig. 29-5

|    |     | PelB- $\beta$ - $\gamma$ |     |     |     |     |     |     |     |                    |     |     |     |     |     |     |   |
|----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
|    |     | M                        | K   | Y   | L   | L   | P   | T   | A   | A                  | A   | G   | L   | L   | L   | L   | L |
| +1 | 1   | ATG                      | AAA | TAC | CTA | TTG | CCT | ACG | GCA | GCC                | GCT | GGA | TTG | TTA | TTA | CTC |   |
|    |     | TAC                      | TTT | ATG | GAT | AAC | GGA | TGC | CGT | CGG                | CGA | CCT | AAC | AAT | AAT | GAG |   |
|    |     |                          |     |     |     |     |     |     |     | VH                 |     |     |     |     |     |     |   |
| +1 | 45  | A <sup>3</sup>           | A   | Q   | P   | A   | M   | A   | E   | V                  | Q   | L   | Q   | Q   | S   | G   |   |
|    |     | GCG                      | GCC | CAG | CCG | GCC | ATG | GCG | GAG | GTT                | CAG | CTT | CAG | CAG | TCT | GGA |   |
|    |     | CGC                      | CGG | GTC | GGC | CGG | TAC | CGC | CTC | CAA                | GTC | GAA | GTC | GTC | AGA | CCT |   |
| +1 | 91  | P                        | E   | L   | V   | K   | P   | G   | A   | S                  | V   | K   | I   | S   | C   | K   |   |
|    |     | CCT                      | GAG | CTG | GTG | AAG | CCC | GGG | GCC | TCA                | GTG | AAG | ATT | TCC | TGC | AAA |   |
|    |     | GGA                      | CTC | GAC | CAC | TTC | GGG | CCC | CGG | AGT                | CAC | TTC | TAA | AGG | ACG | TTT |   |
| +1 | 135 | A                        | S   | G   | Y   | A   | F   | S   | S   | S                  | W   | M   | N   | W   | V   | K   |   |
|    |     | GCT                      | TCT | GGC | TAC | GCA | TTC | AGT | AGC | TCT                | TGG | ATG | AAC | TGG | GTG | AAG |   |
|    |     | CGA                      | AGA | CCG | ATG | CGT | AAG | TCA | TCG | AGA                | ACC | TAC | TTG | ACC | CAC | TTC |   |
| +1 | 181 | Q                        | R   | P   | G   | Q   | G   | L   | E   | W                  | I   | G   | R   | I   | Y   | P   |   |
|    |     | CAG                      | AGG | CCT | GGA | CAG | GGT | CTT | GAG | TGG                | ATT | GGA | CGG | ATT | TAT | CCT |   |
|    |     | GTC                      | TCC | GGA | CCT | GTC | CCA | GAA | CTC | ACC                | TAA | CCT | GCC | TAA | ATA | GGA |   |
| +1 | 226 | G                        | N   | G   | D   | T   | N   | Y   | N   | G                  | K   | F   | K   | G   | K   | A   |   |
|    |     | GGA                      | AAT | GGA | GAT | ACT | AAC | TAC | AAT | GGG                | AAG | TTC | AAG | GGC | AAG | GCC |   |
|    |     | CCT                      | TTA | CCT | CTA | TGA | TTG | ATG | TTA | CCC                | TTC | AAG | TTC | CCG | TTC | CGG |   |
| +1 | 271 | T                        | L   | T   | A   | D   | K   | S   | S   | S                  | T   | A   | Y   | M   | Q   | L   |   |
|    |     | ACA                      | CTG | ACT | GCA | GAC | AAA | TCC | TCC | AGC                | ACA | GCC | TAC | ATG | CAG | CTC |   |
|    |     | TGT                      | GAC | TGA | CGT | CTG | TTT | AGG | AGG | TCG                | TGT | CGG | ATG | TAC | GTC | GAG |   |
| +1 | 316 | S                        | S   | L   | T   | S   | V   | D   | S   | A                  | V   | Y   | F   | C   | A   | D   |   |
|    |     | AGC                      | AGC | CTG | ACC | TCT | GTG | GAC | TCT | GCG                | GTC | TAT | TTC | TGT | GCA | GAT |   |
|    |     | TCG                      | TCG | GAC | TGG | AGA | CAC | CTG | AGA | CGC                | CAG | ATA | AAG | ACA | CGT | CTA |   |
| +1 | 361 | G                        | N   | V   | Y   | Y   | Y   | A   | M   | D                  | Y   | W   | G   | Q   | G   | T   |   |
|    |     | GGT                      | AAC | GTA | TAT | TAC | TAT | GCT | ATG | GAC                | TAC | TGG | GGT | CAA | GGA | ACC |   |
|    |     | CCA                      | TTG | CAT | ATA | ATG | ATA | CGA | TAC | CTG                | ATG | ACC | CCA | GTT | CCT | TGG |   |
|    |     |                          |     |     |     |     |     |     |     | $\beta$ - $\delta$ |     |     |     |     |     |     |   |
| +1 | 406 | S                        | V   | T   | V   | S   | S   | G   | G   | G                  | S   | G   | G   | R   | A   |     |   |
|    |     | TCA                      | GTC | ACC | GTC | TCC | TCA | GGT | GGA | GGC                | GGT | TCA | GGT | GGG | CGC | GCC |   |
|    |     | AGT                      | CAG | TGG | CAG | AGG | AGT | CCA | CCT | CCG                | CCA | AGT | CCA | CCC | CGC | CGG |   |

Fig. 30-1

| ( 図30a773 ) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | S   | G   | G   | G   | G   | S   | Q   | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | A   |  |  |
| 451         | TCT | GGC | GGT | GGC | GGA | TCG | CAA | ATT | GTI | CTC | ACC | CAG | TCI | CCT | AGT |  |  |
|             | AGA | CCG | CCA | CCG | CCT | AGC | GTI | TAA | CAA | GAG | TGG | GTC | AGA | GGA | CGA |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | S   | L   | A   | V   | S   | L   | G   | Q   | R   | A   | T   | I   | S   | C   | R   |  |  |
| 496         | TCT | TTA | GCT | GTA | TCT | CTG | GGG | CAG | AGG | GCC | ACC | ATC | TCA | TGC | AGG |  |  |
|             | AGG | AAT | CGA | CAT | AGA | GAC | CCC | GTC | TCC | CGG | TGG | TAG | AGT | ACG | TCC |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | A   | S   | K   | S   | V   | S   | T   | S   | G   | Y   | S   | Y   | M   | H   | W   |  |  |
| 541         | GCC | AGC | AAA | AGT | GTC | AGT | ACA | TCT | GGC | TAT | AGT | TAT | ATG | CAC | TGG |  |  |
|             | CGG | TCG | TTT | TCA | CAG | TCA | TGT | AGA | CCG | ATA | TCA | ATA | TAC | GTG | ACC |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | Y   | Q   | Q   | K   | P   | G   | Q   | P   | P   | K   | L   | L   | I   | Y   | L   |  |  |
| 586         | TAC | CAA | CAG | AAA | CCA | GGA | CAG | CCA | CCC | AAA | CTC | CTC | ATC | TAT | CTT |  |  |
|             | ATG | GTT | GTC | TTT | GGT | CCT | GTC | GGT | GGG | TTT | GAG | GAG | TAG | ATA | GAA |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | A   | S   | N   | L   | E   | S   | G   | V   | P   | A   | R   | F   | S   | G   | S   |  |  |
| 631         | GCA | TCC | AAC | CTA | GAA | TCT | GGG | GTC | CCT | GCC | AGG | TTC | AGT | GGC | AGT |  |  |
|             | CGT | AGG | TTG | GAT | CTT | AGA | CCC | CAG | GGA | CGG | TCC | AAG | TCA | CCG | TCA |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | G   | S   | G   | T   | D   | F   | T   | L   | N   | I   | H   | P   | V   | E   | E   |  |  |
| 676         | GGG | TCT | GGG | ACA | GAC | TTC | ACC | CTC | AAC | ATC | CAT | CCT | GTG | GAG | GAG |  |  |
|             | CCC | AGA | CCC | TGT | CTG | AAG | TGG | GAG | TTG | TAG | GTA | GGA | CAC | CTC | CTC |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | E   | D   | A   | A   | T   | Y   | Y   | C   | Q   | H   | S   | R   | E   | L   | P   |  |  |
| 721         | GAG | GAT | GCT | GCA | ACC | TAT | TAC | TGT | CAG | CAC | AGT | AGG | GAG | CTT | CCT |  |  |
|             | CTC | CTA | CGA | CGT | TGG | ATA | ATG | ACA | GTC | GTG | TCA | TCC | CTC | GAA | GGA |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | R   | T   | F   | G   | G   | G   | T   | K   | L   | E   | I   | K   | R   | A   | A   |  |  |
| 766         | CGG | ACG | TTC | GGT | GGA | GGC | ACC | AAG | CTG | GAA | ATC | AAA | CGG | GGC | GCC |  |  |
|             | GCC | TGC | AAG | CCA | CCT | CCG | TGG | TTC | GAC | CTT | TAG | TTT | GCC | CGC | CGG |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | A   | P   | K   | P   | S   | T   | P   | P   | G   | S   | S   | R   | M   | K   | Q   |  |  |
| 811         | GCA | CCG | AAG | CCT | TCC | ACT | CCG | CCC | GGG | TCT | TCC | CGT | ATG | AAA | CAG |  |  |
|             | CGT | GGC | TTC | GGA | AGG | TGA | GGC | GGG | CCC | AGA | AGG | GCA | TAC | TTT | GTC |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | L   | E   | D   | K   | V   | E   | E   | L   | L   | S   | K   | N   | Y   | H   | L   |  |  |
| 856         | CTG | GAA | GAC | AAA | GTA | GAG | GAG | CTC | CTT | AGC | AAG | AAC | TAC | CAT | CTA |  |  |
|             | GAC | CTT | CTG | TTT | CAT | CTC | CTC | GAG | GAA | TCG | TTC | TTG | ATG | GTA | GAT |  |  |
|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1          | E   | N   | E   | V   | A   | R   | L   | K   | K   | L   | V   | G   | E   | R   | G   |  |  |
| 901         | GAA | AAC | GAG | GTA | GCT | CGT | CTG | AAA | AAG | CTT | GTT | GGT | GAA | CGT | GGT |  |  |
|             | CIT | TTG | CTC | CAT | CGA | GCA | GAC | TTT | TTC | GAA | CAA | CCA | CTT | GCA | CCA |  |  |

Fig. 30-2

(西 30-3)

|     |       |         |     |     |     |     |     |     |   |
|-----|-------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
|     | スベ-サニ | His-97" |     |     |     |     |     |     |   |
| +1  | G     | H       | H   | H   | H   | H   | H   | H   | * |
| 946 | GGT   | CAC     | CAT | CAC | CAT | CAC | CAT | TAA |   |
|     | CCA   | GTG     | GTA | GTG | GTA | GTG | GTA | ATT |   |

Fig. 30-3

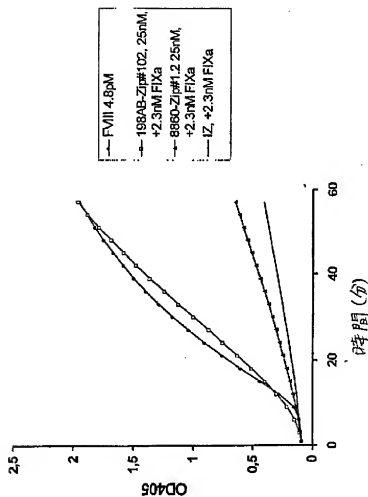
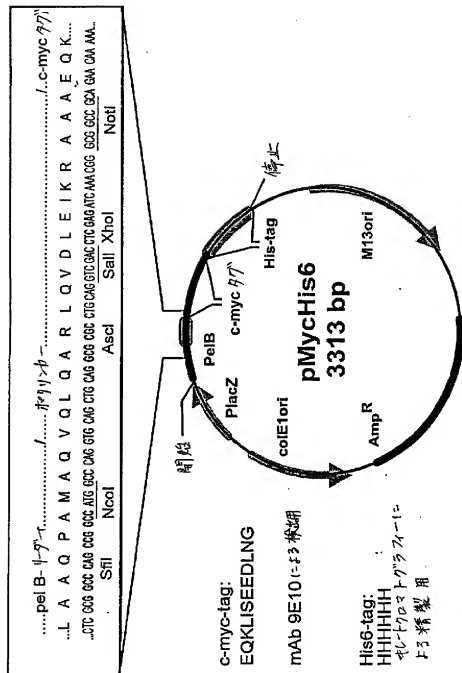


Fig. 31



*HindIII*

2206 CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTC CAT GAA AAT  
GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAG GTA CTT TTA

*PelB-9<sup>n</sup>*

M K Y L L P T

2251 TCT ATT TCA AGG AGA CAG TCA TAA TGA AAT ACC TAT TGC CTA CGG  
AGA TAA AGT TCC TCT GTC AGT ATT ACT TTA TGG ATA ACG GAT GCC

A A A G L L L L A A Q P A M A

*SfiI*

2296 CAG CCG CTG GAT TGT TAT TAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CCC  
GTC GGC GAC CTA ACA ATA ATG AGC GCC GGG TCG GCC GGT ACC GGG

ポリリンカー:

Q V Q L Q A R L Q V D L E I K

*AscI*

2341 AGG TGC AGC TGC AGG CCC GCC TGC AGG TCG ACC TCG AGA TCA AAC  
TCC ACG TCG ACG TCC CGC CGG ACG TCC AGC TGG AGC ICT AGT TTG

R | *XbaI-9<sup>n</sup>* | *Myc-9<sup>n</sup>*  
A A A | E Q K L I S E E D L N  
NotI

2386 GGG CCG CCG CAG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGA ATG  
CCC GCC GGC GTC TTG TTT TTG AGT AGA GTC TTC TCC TAG ACT TAC

R<sup>9</sup>-9<sup>n</sup> Hls 9<sup>n</sup>

G A A H H H H H H \* \*

*EcoRI*

2431 GGG CCG CAG ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAT AAG AAT TCA CTG GCC  
CCC GCC GTG TAG TGG TAG TGG TAG TGA TTA TTC TTA AGT GAC CGG

Fig. 33

|     |     | PolB- 1/-9'- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| +1  | M   | K            | Y   | L   | L   | P   | T   | A   | A   | A   | G   | L   | L   | L   | L   |  |  |
| 1   | ATG | AAA          | TAC | CTA | TTG | CCT | ACG | GCA | GCC | GCT | GGA | TTG | TTA | TTA | CTC |  |  |
|     | TAC | TTT          | ATG | GAT | AAC | GGA | TGC | CGT | CGG | CGA | CCT | AAC | AAT | AAT | GAG |  |  |
|     |     | VH           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | A   | A            | Q   | P   | A   | M   | A   | E   | V   | K   | L   | V   | E   | S   | G   |  |  |
| 46  | GCG | GCC          | CAG | CCG | GCC | ATG | GCC | GAG | GTG | AAG | CTG | GTG | GAG | TCT | GGG |  |  |
|     | CGC | CGG          | GTG | GGC | CGG | TAC | CGG | CTC | CAC | TTC | GAC | CAC | CTC | AGA | CCC |  |  |
| +1  | G   | G            | L   | V   | K   | P   | G   | G   | S   | L   | K   | L   | S   | C   | A   |  |  |
| 91  | GGA | GGC          | TTA | GTG | AAG | CCT | GGA | GGG | TCC | CTG | AAA | CTC | TCC | TGT | GCA |  |  |
|     | CCT | CCG          | AAT | CAC | TTC | GGA | CCT | CCC | AGG | GAC | TTT | GAG | AGG | ACA | CGT |  |  |
| +1  | A   | S            | G   | F   | T   | F   | S   | S   | Y   | T   | M   | S   | W   | V   | R   |  |  |
| 136 | GCC | TCT          | GGA | TTC | ACT | TTC | AGT | AGC | TAT | ACC | ATG | TCT | TGG | GTT | CGC |  |  |
|     | CGG | AGA          | CCT | AAG | TGA | AAG | TCA | TCG | ATA | TGG | TAC | AGA | ACC | CAA | GCG |  |  |
| +1  | Q   | T            | P   | E   | K   | R   | L   | E   | W   | V   | A   | T   | I   | S   | S   |  |  |
| 181 | CAG | ACT          | CCG | GAG | AAG | AGG | CTG | GAG | TGG | GTG | GCA | ACC | ATT | AGT | AGT |  |  |
|     | GTG | TGA          | GGC | CTC | TTC | TCC | GAC | CTC | ACC | CAG | CGT | TGG | TAA | TCA | TCA |  |  |
| +1  | G   | G            | S   | S   | T   | Y   | Y   | P   | D   | S   | V   | K   | G   | R   | F   |  |  |
| 226 | GGN | GGT          | AGT | TCC | ACC | TAC | TAT | CCA | GAC | AGT | GTG | AAG | GGC | CGA | TTC |  |  |
|     | CCN | CCA          | TCA | AGG | TGG | ATG | ATA | GGT | CTG | TCA | CAC | TTC | CCG | GCT | AAG |  |  |
| +1  | T   | I            | S   | R   | D   | N   | A   | K   | N   | T   | L   | Y   | L   | Q   | M   |  |  |
| 271 | ACC | ATC          | TCC | AGA | GAC | AAT | GCC | AAG | AAC | ACC | CTG | TAC | CTG | CAA | ATG |  |  |
|     | TGG | TAG          | AGG | TCT | CTG | TTA | CGG | TTC | TTG | TGG | GAC | ATG | GAC | GTT | TAC |  |  |
| +1  | S   | S            | L   | R   | S   | E   | D   | T   | A   | M   | Y   | Y   | C   | T   | R   |  |  |
| 316 | AGC | AGT          | CTG | AGG | TCT | GAG | GAC | ACA | GCC | ATG | TAT | TAC | TGT | ACA | AGA |  |  |
|     | TCG | TCA          | GAC | TCC | AGA | CTC | CTG | TGT | CGG | TAC | ATA | ATG | ACA | TGT | TCT |  |  |
| +1  | E   | G            | G   | G   | F   | T   | V   | N   | W   | Y   | F   | D   | V   | W   | G   |  |  |
| 361 | GAG | GGG          | GGT | GGT | TTC | ACC | GTG | AAC | TGG | TAC | TTC | GAT | GTG | TGG | GGC |  |  |
|     | CTC | CCC          | CCA | CCA | AAG | TGG | CAG | TTG | ACC | ATG | AAG | CTA | CAG | ACC | CGG |  |  |
|     |     | 1/-9'-       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | A   | G            | T   | S   | V   | T   | V   | S   | S   | G   | G   | G   | S   | G   |     |  |  |
| 406 | GCA | GGA          | ACC | TCA | GTC | ACC | GTC | TCC | TCA | GGT | GGA | GGC | GGT | TCA | GGT |  |  |
|     | CGT | CCT          | TGG | AGT | CAG | TGG | CAG | AGG | AGT | CCA | CCT | CCG | CCA | AGT | CCA |  |  |
|     |     | VK           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1  | G   | R            | A   | S   | G   | G   | G   | S   | D   | I   | V   | L   | T   | Q   |     |  |  |
| 451 | GGG | CGC          | GCC | TCT | GGC | GGT | GGC | GGA | TGG | GAC | ATT | GTG | CTG | ACA | CAG |  |  |

Fig. 34-1

(2) 340773)

CCC GCG CGG ASA CCG CCA CCG CCT AGC CTG TAA CAC GAC TGT GTC

+1 S P A S L A V S L G Q R A T I  
 496 TCT CCA GCT TCT TTG GCT CTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA  
 AGA GGT CGA ASA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CGG TGG TAT

+1 S C R A S E S V D S Y G Y N F  
 541 TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT  
 AGG ACG TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG ATA TTA AAA

+1 M H W Y Q Q I P G Q P P K L L  
 586 ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC  
 TAC GTG ACC ATA GTC GTC TAT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG

+1 I Y R A S N L E S G I P A R F  
 631 ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC  
 TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTC AGA CCC TAG GSA CGG TCC AAG

+1 S G S G S R T D F T L T I N P  
 676 AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT  
 TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG GAG TGG TAA TTA GGA

+1 V E A D D V A T Y Y C Q Q S N  
 721 GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT  
 CAC CTC CGA CTA CTA CAA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA

+1 E D P L T F G T G T R L E I K  
 766 GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA  
 CTC CTA GGC GAG TGC AAG CCA TGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT

280-4- Myc-771

+1 R A A A E Q K L I S E E D L N  
 811 CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT  
 GCC CGC CGG CGT CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TTA

280-4- His-771

+1 G A A H H H H H H \* \*  
 856 GGG GCG GCA CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA TAA  
 CCC CGC CGT GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATT

Fig. 34-2



|                         |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| PolB- 11-7 <sup>1</sup> |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1                      | M   | K   | Y   | L   | L   | P   | T                 | A   | A   | A   | G   | L   | L   | L   | L   |  |  |
| 1                       | ATG | AAA | TAC | CTA | TTG | CCT | ACG               | GCA | GCC | GCT | GGA | TTG | TTA | TTA | CTC |  |  |
|                         | TAC | TTT | ATG | GAT | AAC | GGA | TGC               | CGT | CGG | CGA | CCT | AAC | AAT | AAT | GAG |  |  |
|                         |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1                      | A   | A   | Q   | P   | A   | M   | A                 | VH  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 46                      | GCG | GCC | CAG | CCG | GCC | ATG | GCC               | E   | V   | Q   | L   | Q   | Q   | S   | G   |  |  |
|                         | CGC | CGG | GTC | GGC | CGG | TAC | CGG               | CTC | CAA | GTC | GAA | GTC | GTG | AGA | CTT |  |  |
| +1                      | P   | E   | L   | V   | K   | P   | G                 | A   | S   | V   | K   | I   | S   | C   | K   |  |  |
| 91                      | CCT | GAG | CTG | GTG | AAG | CCC | GGG               | GCC | TCA | GTG | AAG | ATT | TCC | TGC | AAA |  |  |
|                         | GGA | CTC | GAC | CAC | TTC | GGG | CCC               | CGG | AGT | CAC | TTC | TAA | AGG | ACG | TTT |  |  |
| +1                      | A   | S   | G   | Y   | A   | F   | S                 | S   | S   | W   | N   | N   | N   | V   | K   |  |  |
| 136                     | GCT | TCT | GGC | TAC | GCA | TTT | AGT               | AGC | TCT | TGG | ATG | ATC | TGG | GTG | AAG |  |  |
|                         | CGA | AGA | CCG | ATG | CGT | AAG | TCA               | TCG | AGA | ACC | TAC | TTG | ACC | CAC | TTT |  |  |
| +1                      | Q   | R   | P   | G   | Q   | G   | L                 | E   | W   | I   | G   | R   | I   | Y   | P   |  |  |
| 181                     | CAG | AGG | CCT | GGA | CAG | GGT | CTT               | GAG | TGG | ATT | GGA | CGG | ATT | TAT | CCT |  |  |
|                         | GTC | TCC | GGA | CCT | GTC | CCA | GAA               | CTC | ACC | TAA | CCT | GCC | TAA | ATA | GGA |  |  |
| +1                      | G   | N   | G   | D   | T   | N   | Y                 | N   | G   | K   | F   | K   | G   | K   | A   |  |  |
| 226                     | GGA | AAT | GGA | GAT | ACT | AAC | TAC               | AAT | GGG | AAG | TTC | AAG | GGC | AAG | GCC |  |  |
|                         | CCT | TTA | CCT | CTA | TGA | TTG | ATG               | TTA | CCC | TTC | AAG | TTC | CCG | TTC | CGG |  |  |
| +1                      | T   | L   | T   | A   | D   | K   | S                 | S   | S   | T   | A   | Y   | M   | Q   | L   |  |  |
| 271                     | ACA | CTG | ACT | GCA | GAC | AAA | TCC               | TCC | AGC | ACA | GCC | TAC | ATG | CAG | CTC |  |  |
|                         | TGT | GAC | TGA | CGT | CTG | TTT | AGG               | AGG | TCG | TGT | CGG | ATG | TAC | GTG | GAG |  |  |
| +1                      | S   | S   | L   | T   | S   | V   | D                 | S   | A   | V   | Y   | F   | C   | A   | D   |  |  |
| 316                     | AGC | AGC | CTG | ACC | TCT | GTG | GAC               | TCT | GCG | GTC | TAT | TTC | TGT | GCA | GAT |  |  |
|                         | TGG | TCG | GAC | TGG | AGA | CAC | CTG               | AGA | CGC | CAG | ATA | AAG | ACA | CGT | CTA |  |  |
| +1                      | G   | N   | V   | Y   | Y   | Y   | A                 | M   | D   | Y   | W   | G   | Q   | G   | T   |  |  |
| 361                     | GGT | AAC | GTA | TAT | TAC | TAT | GCT               | ATG | GAC | TAC | TGG | GGT | CAA | GGA | ACC |  |  |
|                         | CCA | TTG | CAT | ATA | ATG | ATA | CGA               | TAC | CTG | ATG | ACC | CCA | GTT | CCT | TGG |  |  |
|                         |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1                      | S   | V   | T   | V   | S   | S   | 11-7 <sup>1</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 408                     | TCA | GTC | ACC | GTC | TCC | TCA | GGT               | GGA | GGC | GGT | TCA | GGT | GGG | CGC | GCC |  |  |
|                         | AGT | CAG | TGG | CAG | AGG | AGT | CCA               | CCT | CCG | CCA | AGT | CCA | CCC | CGC | CGG |  |  |
|                         |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| +1                      | S   | G   | G   | G   | G   | S   | VI                |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 451                     | TCT | GGC | GGT | GGC | GGA | TCG | CAA               | ATT | GTT | CTC | ACC | CAG | TCT | CCT | GCT |  |  |
|                         | AGA | CCG | CCA | CCG | CCT | AGC | GTT               | TAA | CAA | GAG | TGG | GTC | AGA | GGA | CGA |  |  |

Fig. 35-1

(図 35-1 の注)

+1 S L A V S L G Q R A T I S C R  
496 TCC TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG  
AGG AAT CGA CAT AGA GAC CCC GTC TCC CGG TGG TAG AGT ACG TCC

+1 A S K S V S T S G Y S Y M H W  
541 GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG  
CGG TCG TTT TCA CAG TCA TGT AGA CCG ATA TCA ATA TAC GTG ACC

+1 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L  
586 TAC CRA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT  
ATG GTT GTC TTT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GAA

+1 A S N L E S G V P A R F S G S  
631 GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT  
CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC CAG GGA CGG TCC AAG TCA CCG TCA

+1 G S G T D F T L N I H P V E E  
676 GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CQT GTG GAG GAG  
CCC AGA CCC TGT CTG AAG TGG GAG TTG TAG GTA GGA CAC CTC CTC

+1 E D A A T Y Y C Q H S R E L P  
721 GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAG CTT CCT  
CTC CTA CGA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTG TCA TCC CTC GAA GGA

+1 R T F G G G T K L E I K R  
766 CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG  
GCC TGC AAG CCA CCT CCG TGG TTC GAC CTT TAG TTT GCC

+1 A E Q K L I S E E D L N G  
811 GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCG GCA  
CGT CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TTA CCC CGC CGT

His 97<sup>n</sup>  
+1 H H H H H H \*  
856 CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA  
GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT

Fig. 35-2

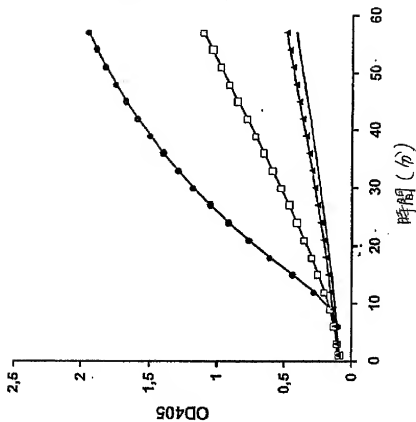


Fig. 36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
PCT/EP 00/08936

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/13 C07K16/40 C12N5/20 A61K39/395 A61P7/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than mentioned documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBASE, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | NILSSON I M ET AL: "Induction of split tolerance and clinical cure in high-responding hemophiliacs with factor IX antibodies"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 83, no. 23, 1986, pages 9169-9173, XP002164050<br>1986<br>ISSN: 0027-8424<br>abstract<br>page 9169, column 2, paragraph 2 | 1-24                  |
| A          | WO 95 13300 A (EZBAN RASMUSSEN MIRELLA :KJALKE MARIANNE (DK); NOVONORDISK AS (DK)) 18 May 1995 (1995-05-18)<br>claims 1-12<br>Seq. No. 2  | 1-24                  |

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and made available with the application for cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2001

Date of mailing of the international search report

11/04/2001

 Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5518 Patentcase 2  
NL - 2200 AV Leidschendam  
Tel: (+31-70) 340-2040, telex 31 801 epon, NL  
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Muller-Thomalla, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet, July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No.  
PCT/EP 00/08936

## 2. (Continuation of) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>BAJAJ S P ET AL: "A monoclonal antibody to factor IX that inhibits the factor VIII:Ca potentiation of factor X activation"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC., US, vol. 260, no. 21, 25 September 1985 (1985-09-25), pages 11574-11576, 11578-11580, XP002922137 ISSN: 0021-9258 abstract</p> | 1-24                  |

File: PCT/ISA/116 (continuation of previous phase) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08936

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 20-22 and 24 (insofar as an in vivo method is concerned) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the immaterial Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 00/08936

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9513300 A                              | 18-05-1995          | AU 8140094 A               | 29-05-1995          |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 1992

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | ターコード (参考) |
|--------------------------|---|---------------|------------|
| C 1 2 N 5/10             |   | C 1 2 P 21/08 |            |
| 15/02                    |   | C 1 2 N 15/00 | Z N A A    |
| C 1 2 P 21/02            |   |               | B          |
| // C 1 2 P 21/08         |   | 5/00          | B          |
| (81)指定国                  | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, E S, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, K R, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S I, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW |               |            |
| (72)発明者                  | ファルクナー, ファルコーギンター<br>オーストリア国 アー2304 オルト/ド<br>ナウ, ノイジードルツァイレ 76アー  |               |            |
| (72)発明者                  | ドルナー, フリードリッヒ<br>オーストリア国 アー1230 ウィーン,<br>ペーターリーニガッセ 17  |               |            |
| (72)発明者                  | シュバルツ, ハンス ペーター<br>オーストリア国 アー1180 ウィーン,<br>シンドラーガッセ 38  |               |            |
| Fターム(参考)                 | 4B024 AA01 BA44 BA61 CA02 CA10<br>DA02 HA03<br>4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24<br>DA01<br>4B065 AA90 AB01 AB04 CA24 CA25<br>CA44<br>4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB33<br>BB35 BB36 BB37 CC32 DD33<br>DD34 DD62 EE01 GG01<br>4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75<br>DA76 EA24 FA74  |               |            |